

Aus der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**In vitro Untersuchung der
Fibroblastenadhäsion
und -proliferation
an oberflächenmodifizierten
Titanwerkstoffen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Matthias Richard
aus München

Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr.Dr. M.Klein
 2. Prof. Dr.Dr. B.Hoffmeister
 3. Prof. Dr.Dr. K.-D.Wolff

Datum der Promotion: 11.10.2002

Datum der Einreichung: 31.05.2002

Was immer Du tun kannst oder erträumst tun zu können, beginne es.

Kühnheit besitzt Genie,
Macht und Magische Kraft.
Beginne es jetzt.

Johann Wolfgang Goethe

Meiner Tochter Clara gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Epithesen.....	2
1.3	Hautdurchleitungen - perkutane Implantate	4
1.4	Haut und Bindegewebe	6
1.5	Wundheilung und Gewebereaktion.....	8
1.6	Werkstoffe	10
1.7	Biokompatibilität und –funktionalität.....	12
1.8	Oberflächentopographie	14
1.9	Zelladhäsion an azellulärer und zellulärer Materie.....	18
1.10	Radio frequency glow discharge.....	21
1.11	Vielschrittige Gestaltwandlung und kontaktinduzierte Zellspreitung	22
1.12	Vermeidungsstrategien von Implantatkomplikationen.....	23
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	24
3	Material und Methode	26
3.1	Vorversuche	26
3.2	Versuchsdurchführung.....	31
3.3	Verwendete Zellart und Zellkultivierung	35
3.4	Statistische Verfahren.....	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Ergebnisse der Vorversuche	37
4.2	Ergebnisse der Hauptversuche.....	39
4.3	Ergebnisse der Zellzählung via Neubauer-Zählkammer	39
4.3.1	RFGD-Verfahren versus ohne RFGD-Verfahren.....	39

4.3.2	Ergebnisse für die 12-Stunden-Werte	42
4.3.3	Ergebnisse für die 72-Stunden-Werte	43
4.3.4	Vergleichende Betrachtungen – deskriptive Auswertungen	45
4.4	Elektronenmikroskopische Befunde.....	48
4.4.1	Fibroblastenwachstum und Kolonienbildung	48
4.4.2	Qualitative Bewertung des Zellbewuchses	53
4.5	Werkstoffanalyse	56
4.5.1	Oberflächen der Titanplättchen	56
4.5.2	Benetzbarkeit modifizierter Titanplättchenoberflächen	57
4.5.3	Spurenelementanalyse	58
5	Diskussion.....	59
5.1	Diskussion des Materials	59
5.2	Diskussion der Methode	66
5.3	Diskussion der Ergebnisse	71
5.4	Fazit und Ausblick.....	75
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis.....	79
8	Anhang	95
8.1	Materialien	95
8.2	Tabellen	97
8.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	100
8.4	Danksagung.....	101
8.5	Lebenslauf	103

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Behandlung vieler Erkrankungen und Verletzungen erfordert oftmals eine chirurgische Intervention mit dem Ziel, Organfunktionen zu erhalten, zu verbessern, zu ergänzen oder gar zu ersetzen. Im Interesse des Behandlungserfolges ist nicht selten der Einsatz einer Vielzahl sog. *Biomaterialien* wie synthetischer Polymere, Materialien biologischer Herkunft, Metalle und Keramiken notwendig. Die Anwendung solcher Biomaterialien reicht von großvolumigen Vorrichtungen, wie beispielsweise künstlichen Organen, Gefäß- und Gelenkprothesen sowie Epithesen, bis hin zu kleinsten Implantaten wie Herzklappen, Augenlinsen oder extra- und intraoralen Implantaten.

Viele dieser Implantate führten in den letzten Jahrzehnten zu beachtlichen therapeutischen Erfolgen. So werden Biomaterialien zunehmend häufiger zu diagnostischen, therapeutischen und kosmetischen Zwecken eingesetzt. Dennoch stößt deren Anwendung durch die Problematik der Bioverträglichkeit an ihre Grenzen. Hier sind ungünstige Wechselwirkungen zwischen *Werkstoffoberflächen* und *umgebendem Biosystem (host tissue)* limitierende Einflussgrößen des Implantaterfolges.

Der Implantaterfolg wird wesentlich von der Biokompatibilität und der chirurgischen Vorgehensweise, respektive der Art der Implantatverankerung bestimmt. Demgegenüber beeinflussen geometrische Konfiguration, mechanische Materialeigenschaften und physikochemische Oberflächeneffekte eines Implantats die Biokompatibilität.

Die Herstellung von Implantaten mit optimaler Oberflächenbeschaffenheit, welche die Zelldifferenzierung unterstützt, erfordert die Kenntnis der komplexen Wechselwirkungen zwischen Oberflächencharakteristika, adsorbierten Proteinen und periimplantärem Gewebe. Auf diesen Erkenntnissen fußend kann die Entwicklung neuerer Werkstoffe auf molekularer Ebene zu verfeinerten bzw. biokompatibleren medizinischen Werkstoffen führen (Webb, et al. 1998; Williams 1987; Wintermantel, et al. 1999).

Die hier vorgelegte Studie befasst sich mit dem Problem der Weichgewebsintegration von Implantaten, speziell von *Hautdurchleitungen (Abutments)* extraoraler Titan-Implantate. Im Folgenden werden wesentliche Teilaspekte der Zellbiologie und die Wechselwirkungen zwischen Biosystem und Biomaterial dargestellt, aus welchen sich Problemstellung und Zielsetzung der Studie ergeben.

1.2 Epithesen

Oberflächliche oder äußerliche Gewebedefekte, insbesondere im Gesicht, werden durch individuell angefertigte Ersatzstücke aus körperfremdem Material (Abb.1a u 1b), sog. *Epithesen* (griechisch επιθεσις, abgeleitet vom Verb επιτιθημι auf etwas legen, um etwas abzudecken oder zu verschließen) gedeckt.

Epithesen dienen überwiegend ästhetischen Zwecken, können aber auch die Funktion eines defekten oder fehlenden Körperteils übernehmen. So kann eine Ohrepithese das Richtungshören verbessern oder eine Brille das Tragen eines Luftleitungshörgerätes ermöglichen (Albrektsson 1985; Klein 1999; Tjellström, et al. 1981). KLEIN entwickelte für Patienten mit einseitigem Augenverlust eine Orbita-Epithese, die einen zum gesunden Lid synchronen Lidschlag ermöglicht (Klein 2001; Klein, et al. 1999b). Hierdurch wird eine noch größere Nähe der Epithese zum natürlichen Erscheinungsbild erzielt.

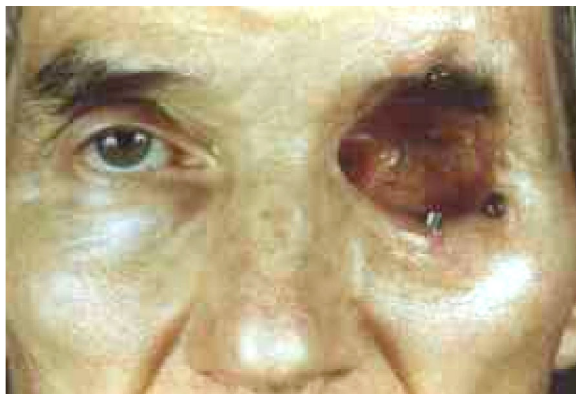


Abb. 1: a) periorbitale implantatfixierte Magnete



b) eingegliederte Orbitaepithese

Das Problem der Fixierung solcher Epithesen wurde früher durch Aufkleben (Cosmesil[®]) oder durch Befestigung an einer Brille gelöst. Heute jedoch werden diese mittels Magneten oder Stegen an knocheninserierten Implantaten befestigt. Dies gewährleistet einen sicheren bzw. verrutschfesten Halt (Parel, et al. 1986; Parel und Tjellström 1991).

BRÄNEMARK, der den Begriff der Osseointegration prägte, wies eine grundsätzliche Überlegenheit der osseointegrierten gegenüber den weichgewebsverankerten Implantaten nach (Brånemark und Albrektsson 1982).

Eine Epithese wird von einem Magneten oder einem Steg getragen. Diese sind ihrerseits über eine Distanzhülse mit der Implantatschraube verbunden (Abb. 2),

(Tjellström 1989; Tjellström 1989 a). Die Fa. Steco-System-Technik entwickelte ein spezielles Magnetabutment, bei dem beide Teile fest miteinander verbunden sind. Der Magnet ist vollständig titangekapselt, die Brånemark-Distanzhülsen bestehen aus Reintitan (Schraubenimplantate/ Fa. Entific Medical Systems, Fa. Straumann etc.). Beide Konstruktionselemente unterliegen jeweils spezifischen Fragestellungen: steht auf Ebene der knöchernen Verankerung die Problematik der *Osseointegration* im Vordergrund, so interessieren auf dem Niveau der Hautdurchleitung vor allem die *Wechselwirkungen zwischen Weichgewebe und Implantatoberfläche*.

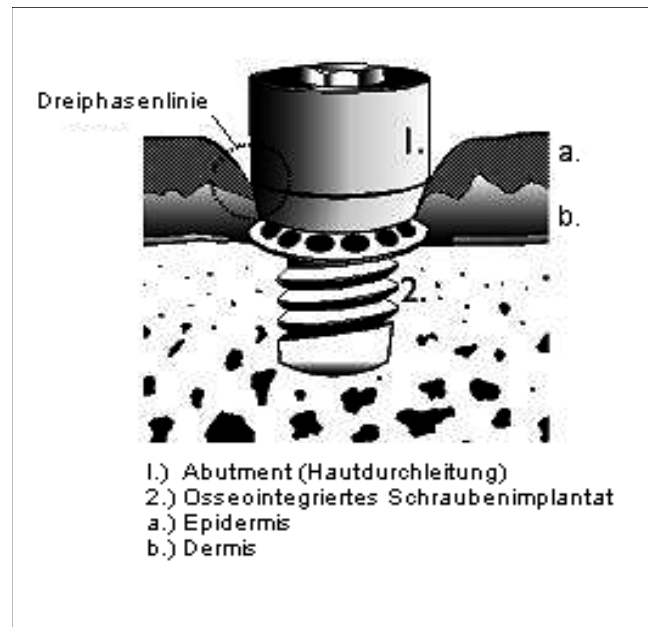


Abb. 2: Distanzhülse mit Implantatschraube

Während eine feste und reizfreie ossäre Integration des alloplastischen Implantates erreicht und unter funktioneller Beanspruchung aufrechterhalten werden kann (Albrektsson, et al. 1981; Brånemark, et al. 1969; Brånemark, et al. 1970), entsteht jedoch durch die Art dieser Epithesenverankerung im Körpergewebe eine neuerliche Problematik: die der ungenügenden Weichgewebeintegration des Implantats. Einerseits soll die Implantatschraube in erster Linie eine sichere Fixierung und Belastungsstabilität gewährleisten, andererseits wird auf Ebene der Haut eine zuverlässige *Gewebe-Implantat-Versiegelung* zur Vermeidung perkutaner Entzündungen angestrebt. Eine solche Implantatversiegelung konnte bisher nicht befriedigend erzielt werden. Zahlreiche Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Implantatintegration in das umgebende Gewebe mittels Modifikationen der Werkstoffoberfläche verbessert werden kann.

1.3 Hautdurchleitungen - perkutane Implantate

In der klinischen und experimentellen Medizin werden Hautdurchleitungen zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken eingesetzt. Als gemeinsames Charakteristikum penetrieren diese die Haut durch einen chirurgisch bzw. iatrogen geschaffenen Defekt. Die intakte Haut schützt den Organismus vor Keiminvasion. Durch das Einbringen perkutaner Implantate wird diese Schutzfunktion lokal durchbrochen. Das sekundäre Einwirken mechanischer Kräfte beeinträchtigt das periimplantäre Gewebe zusätzlich.

Nach GROßE-SIESTRUP ist „eine *Hautdurchleitung* (*percutaneous device*) ein künstlicher Körper aus einem Biomaterial, der iatrogen durch die äußere Haut in den menschlichen oder tierischen Körper geleitet wird“ (Große-Siestrup 1998; Recum 1984; Recum und Park 1981). In diesem Sinne sind auch Zahnimplantate künstliche Hautdurchleitungen.

Anwendungsgebiete für Hautdurchleitungen sind Katheter zur Infusionstherapie und zur Kontrolle des Blutdruckes, Sonden zur Messung physiologischer Parameter, Kabel zur Überwachung elektrischer Signale, Drainagen zur Ableitung von Flüssigkeitsansammlungen und Sekreten, Fixierungsvorrichtungen zur externen Stabilisierung von Knochen, Tuben zur Mittelohr- und Nebenhöhlendrainage oder -belüftung, Kornea-implantate sowie Schrauben zur Verankerung von Epithesen.

Die Linie, an der keimhaltige Luft, durchtrennte Haut und Unterhaut sowie Implantatoberfläche zusammentreffen, wird *Dreiphasenlinie* (Abb. 3) genannt (Große-Siestrup 1998). Die *dauerhafte* Unterbrechung des Integuments an der Dreiphasenlinie verhindert einen zuverlässigen und beständig keimdichten Verschluss. Solange wie eine Integration der künstlichen Hautdurchleitung in das periimplantäre Gewebe nur ungenügend gelingt, besteht die Gefahr einer Infektion an dieser Stelle – Exit-site-Infektion (ESI) oder Austrittsstelleninfektion (ASI).

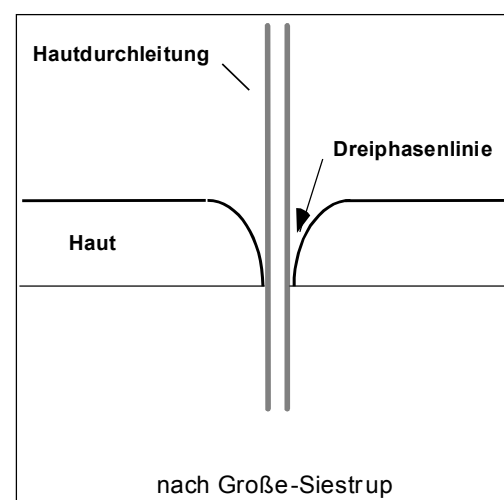


Abb. 3: Dreiphasenlinie

Hautdurchleitungen werden vom Körper als unerwünschte Fremdkörper betrachtet und daher mit einer entsprechenden Reaktion beantwortet, mit dem Ziel, diese abzustößen, zu entgiften oder einzukapseln, um so die schädlichen Wirkungen auf das Gewebe zu beseitigen oder wenigstens zu minimieren (Coleman, et al. 1974). Biomaterialien entfachen an ihrer Kontaktfläche zum Umgebungsgewebe eine komplexe Gewebe-Interface-Interaktion, die zur Freisetzung von chemotaktischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren führt, welche wiederum ihrerseits eine Entzündungsreaktion an der Kontaktfläche zum Implantat hervorrufen und aufrechterhalten (Ziats, et al. 1988).

Mit der Schaffung einer dauerhaft perkutanen Situation wird nach NÜHLEN eine latente Entzündungssituation geschaffen, die eine Abheilung verhindert (Abb. 4). Infolgedessen kann nur ein Gleichgewichtszustand zwischen Heilung und Irritation erreicht werden (Nühlen und Große-Siestrup 1992). Tatsächlich sind rezidivierende, periimplantäre Entzündungen ein typisches Problem extraoraler Titanimplantate, die zur Implantatabstoßung (*Extrusion*) führen können (Holgers, et al. 1992).

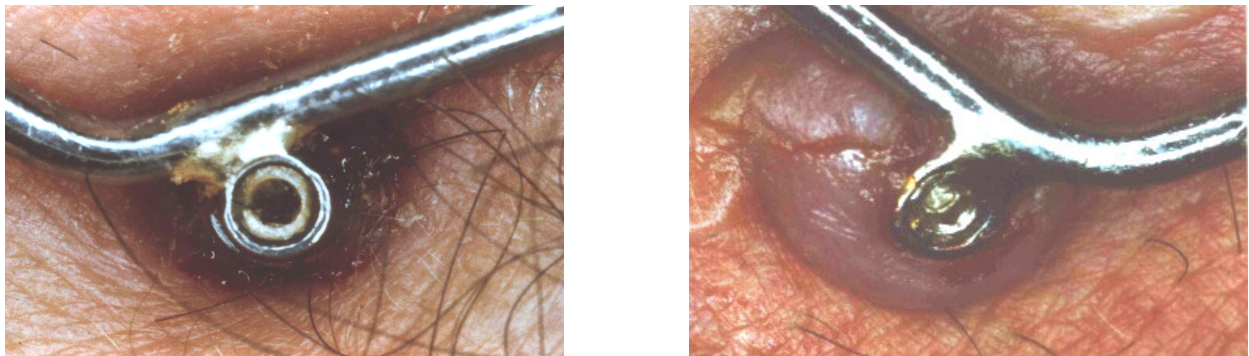


Abb. 4 a, b: Periimplantäre Entzündung an einem transkutanen Implantat mit daran befestigtem Steg

GROßE-SIESTRUP konnte anhand der histologischen Untersuchung einer natürlich vorkommenden Hautdurchleitung, dem Caninus vom Hirscheber (*Babyrussa babyrussa*), aufzeigen, dass trotz massiven Keimvorkommens in der Dreiphasenlinie eine entzündungsfreie Hautdurchleitung ohne gewebliche Irritation möglich ist. Die Verankerung in der bis unter die Haut reichenden Knochenscheide und die auf dem Vorderschädel perifokal des perkutanen Zahnes unverschiebbliche Haut sind Charakteristika, die auch für das Design künstlicher Hautdurchleitungen genutzt werden können (Große-Siestrup 1998). Es handelt sich hier um eine natürliche, permanente, vollständig infektionsfreie und reizlose Hautdurchleitung (Knabe, et al. 1995).

Dahingegen wird beim Menschen eine gesteigerte lokale Immunantwort selbst bei klinisch infektionsfreien Hautdurchleitungen gefunden (Holgers, et al. 1995).

Während das gingivale Epithel die Fähigkeit besitzt, am Zahnschmelz bzw. an einem enoralen dentalen Titanimplantat zu inserieren, entsteht zwischen extraoralem Epithel und der glatt polierten Titanoberfläche der Distanzhülse keine dichte Versiegelung (Gould, et al. 1981; Holgers 1994). Allerdings gelang es GROßE-SIESTRUP einmalig im Tiermodell bei Titanimplantaten (Ti6Al4V), eine in der Literatur (außer von Jansen bei Hydroxylapatit-Implantaten (Jansen, et al. 1990a) noch nicht beschriebene Haftung der Epidermis ohne Tiefenwachstum und ein Anhaften des subepithelialen Bindegewebes an der Implantatoberfläche zu erzielen (Große-Siestrup 1998).

Nach VON RECUM sind die wichtigsten Faktoren für einen Misserfolg von Hautdurchleitungen: 1. die ungenügende Biokompatibilität des Implantatmaterials, 2. die mechanische Irritation an der Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe und schließlich 3. die Besonderheiten der epidermalen Heilung (Recum und Park 1981). Die physiologischen Vorgänge bei der Wundheilung führen insbesondere in der Epidermis zur Abstoßungsreaktion mit dem Ziel eines Verschlusses der Hautläsion.

1.4 Haut und Bindegewebe

Das Integument zeigt einen dreischichtigen Aufbau: 1. Epidermis, 2. Dermis oder Korium und 3. Subkutis oder Hypodermis. Ferner finden sich in der Haut eine Reihe von Anhangsgebilden wie Haare, Nägel, ekrine und apokrine Schweißdrüsen, Talgdrüsen, welche sämtlich epidermale Einstülpungen darstellen und bis in die Subkutis hineinreichen.

Die *Epidermis* besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen, Keratinozyten und dendritischen Zellen (überwiegend Melanozyten). Die *Keratinozyten* sind in vier Schichten angeordnet, der Basalzellschicht, dem Stratum squamosum, dem Stratum granulosum und corneum. Zwischen Letzteren findet sich in einigen Körperregionen, z.B. palmar und plantar, eine zusätzliche Schicht: das Stratum lucidum.

Je vier flache Hornzellen bedecken eine Fläche, der im Basalzellager einhundert schmale Zellen entsprechen (Steigleder 1990). Die Basalzellschicht sitzt der Basallamina auf. Diese trennt die Epidermis von der Dermis und besteht aus Mukopolysacchariden und einem Netzwerk retikulärer Fasern. Über *Hemidesmosomen*

haften die Basalzellen an der Basallamina (Clark 1985; Gabbiani, et al. 1978). Gut ausgebildete Hemidesmosomen kommen nur bei regelrecht adhätierenden Keratinozyten vor (Carter 1965). Die Basalzellschicht ist gröÙtenteils die epidermale Reproduktionszone.

Während der Zelldifferenzierung erfährt die vertikale Architektur der Haut einen fortschreitenden Strukturwandel. Als Besonderheit imponiert hierbei der epidermale Säulenaufbau (epidermal proliferating unit). Durch die Überlappung der jeweiligen Schichten und Interzellularbrücken, den *Desmosomen*, stehen diese Säulen untereinander in Verbindung (Montagna und Parakkal 1974; Rook 1986). Die Desmosomen zeigen an der Innenseite der Zellmembran Verdichtungen, in die Tonofibrillen, welche die Zellgrenzen nicht überschreiten, inserieren. Die Epidermiszellen wandern jedoch nicht von einer Säule zur nächsten (Abb. 5).

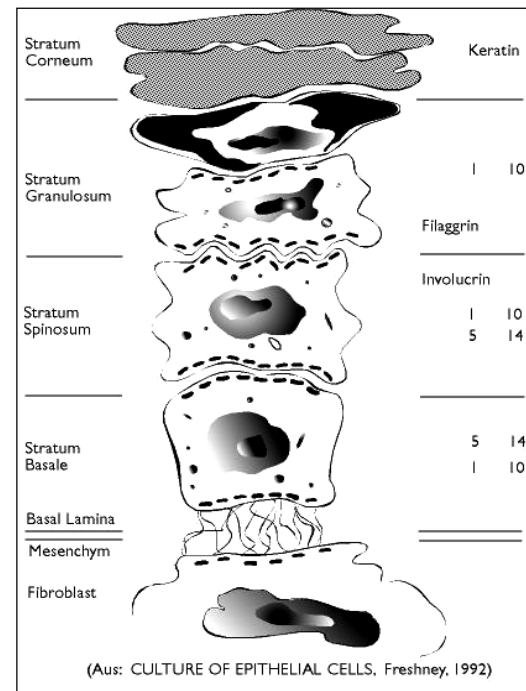


Abb. 5: epidermale Säule

Diesen Säulenformationen kommt die Aufgabe einer zirkulären, keimdichten Versiegelung im Bereich der Hautdurchleitungen zu, indem sie sich rings um den Hautdurchtrittskörper rechtwinklig anlagern (GroÙe-Siestrup 1998).

Die Kommunikation zwischen den benachbarten Säulen und die Steuerung der Zellproliferation unterliegen Besonderheiten der Zelladhäsion, die durch spezifische und unspezifische Proteine der *Extrazellulärmatrix* vermittelt werden (Jauregui 1987). So können Implantate nach Beschichtung mit Makromolekülen der Extrazellulärmatrix (Kollagen (Typ I, Typ II und Typ III), Albuminen und Globulin) in unterschiedlichem AusmaÙ als Adhäsionspartner für Hautzellen betrachtet werden (Hoeft 1989; Kossowsky, et al. 1987). Eine solche Beschichtung mit natürlich vorkommenden Proteinen wird als *Priming* bezeichnet (Thiele 1983).

Die *Dermis* besteht überwiegend aus kollagenem Bindegewebe, in welches mit Elastikafarbstoffen und Silber imprägnierbare Fasern (Vorstufen der elastischen und Kollagen-Fasern) eingelagert sind. Der ubiquitär vorkommende *Fibroblast* ist der Grundbaustein des Bindegewebes und imponiert als spindelförmige, an Bündeln

kollagener Fasern ausgerichtete Zelle. Fibroblasten sezernieren Tropokollagen und Grundsubstanz und dienen der Aufrechterhaltung der *extrazellulären* Gewebekomponenten.

Obschon Epidermis und Dermis strukturell erhebliche Unterschiede aufweisen, sind beide Komponenten voneinander abhängig und funktionieren als ein einheitliches Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte Epidermiszellen, die in Abwesenheit der Dermis kultiviert werden, ihre Säulenformation und die Fähigkeit zur Zellteilung verlieren. Nach Zugabe von dermaletem Gewebe gewannen jedoch die Epidermiszellen diese Fähigkeiten zurück (Breitkreutz, et al. 1989; Recum und Park 1981).

Bindegewebe (connective tissue) ist im Allgemeinen relativ gering differenziert, kann jedoch in spezialisierteren Formen in Erscheinung treten, wobei die eine oder andere Gewebekomponente abhängig vom lokalen strukturellen oder metabolischen Bedarf überwiegen kann. Sämtliche Bindegewebszellen entstammen dem embryonalen Mesenchym, einem Netzwerk primitiver Sternzellen, und besitzen die Fähigkeit zu verschiedenartiger Ausdifferenzierung in Abhängigkeit lokaler Bedingungen. Man nimmt an, dass eine geringe Zahl mesenchymaler Zellen vorzugsweise im Endothel kleinster Blutgefäße des adulten Bindegewebes persistiert. Dort können diese bedarfsweise in die oben angeführten Zellspezies ausdifferenzieren (Bereiter-Hahn, et al. 1984-86; Montagna 1971).

Bei Transplantationsexperimenten mit Cross-Rekombinanten konnte gezeigt werden, dass das zugrunde liegende Mesenchym sowohl instruktive als auch permissive Einflüsse auf die Morphogenese und Zelldifferenzierung des ausgereiften Epithels ausübt (Cunha, et al. 1983; Fusenig 1992; Mackenzie, et al. 1989).

1.5 Wundheilung und Gewebereaktion

Wundheilung kann als Defektverschluss durch Ausbildung einer Narbe mit anschließender Epithelisierung verstanden werden. Bei einem Heilungsvorgang mit einem Fremdkörper wird der Raum zwischen Implantat und Gewebe mit Blut ausgefüllt und ein Geflecht aus Fibrin ausgebildet. Plasmaproteine adsorbieren an der Implantatoberfläche. Fibroblasten und Makrophagen werden aktiviert. Das sich um das Implantat entwickelnde Granulationsgewebe wird von Blutgefäßen durchwachsen. Trotz ungestörter Wundheilung verzögert sich dieser Prozess um zwei bis vier Wochen

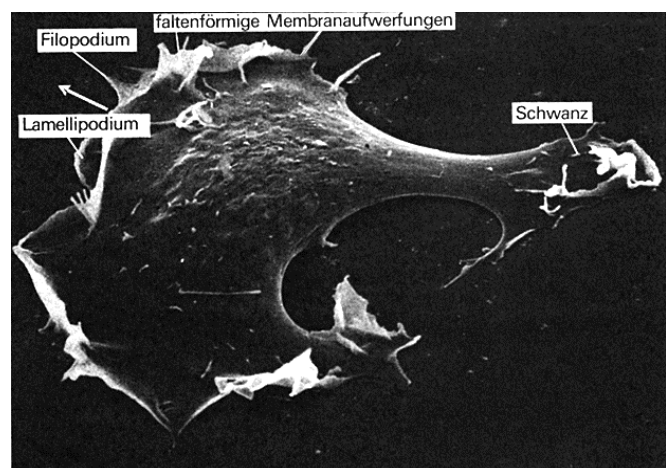
gegenüber einer Abheilung ohne Fremdkörpereinschluss (Williams 1981). Durch lang andauernde Wechselwirkungen mit dem Umgebungsgewebe (Korrosion, Materialabrieb und Materialzerstörung) kann das Implantat zu einem chronischen Infektherd werden.

Bei Organverletzungen werden die Fibroblasten des Stromas stimuliert, proliferieren und besiedeln den Gewebedefekt, wo sie schließlich reichlich Kollagen ablagern und eine fibröse Narbe ausbilden. Gemeinsam mit den Keratinozyten beteiligen sich die Fibroblasten an der Neusynthese der Basallamina. Während der natürlichen Wundheilung adhären die Keratinozyten mittels verschiedener Integrine ihrer Membranen an der Basalmembran.

Die während der Wundheilung aktiven Zellen unterliegen morphologischen Veränderungen und zeigen eine wachsende synthetische Aktivität. Es kommt zur Veränderung der Keratinozytenmorphologie, wobei die Desmosomen und Hemidesmosomen aufgelöst werden (Abb. 6). Auch die Tonofilamente werden retrahiert und in der Zellperipherie entstehen zytoplasmatische *Aktinfilamente* (Lodish, et al. 1996). Chemotaxis, Lokomotion (Weiss 1964), Migration, Zellbewegung und Verdauung sind die zu beobachtenden Vorgänge.

Diese Prozesse unterliegen sowohl einer *Kontaktführung* (contact guidance) seitens beteiligter Strukturen als auch spezifischen Zell-Matrix-Interaktionen.

Abb. 6: Fibroblast (der Pfeil weist in die Bewegungsrichtung); aus: H.Lodish et al., Molekulare Zellbiologie, de Gruyter, 1994



Bereits wenige Stunden nach einer Hautläsion beginnt die Migration der Epidermiszellen vom Wundrand her über die Defektzone (Winter 1962). Die Migration der Zellen wird wesentlich von der Zusammensetzung der Matrixproteine beeinflusst. Während *Fibronectin*, *Kollagen I*, *IV* und *V* die Zellmigration stimulieren (O'Keefe, et al. 1985), wird diese von *Laminin* gehemmt (Woodley, et al. 1988). Auch das unter den Zellen liegende Substrat beeinflusst den Integrin-vermittelten Funktionswechsel zwischen Bewegung und Haftung (Guo, et al. 1990).

Hinsichtlich perkutaner Vorrichtungen (Abutments) sind folgende Besonderheiten der Wundheilung von Bedeutung (Recum und Park 1981):

- Die Epidermis proliferiert nur in ausreichend gut durchblutetem Binde- und Granulationsgewebe; sie ist nicht in der Lage, an avitalem oder Fremdmaterial zu überleben, ebenso wenig kann sie intaktes Gewebe durchwandern.
- Die Umwandlung von Granulationsgewebe in eine reißfeste und haftende Bindegewebsnarbe kann nur erfolgen, wenn eine dichte epidermale Zellschicht das Gewebe vor Austrocknung und Keimbesiedlung schützt.
- Epidermiszellen stellen ihr horizontales Wachstum erst dann ein, wenn sie aufeinander treffen und Kontakt miteinander aufnehmen. Dieses Phänomen wird als *Kontakthemmung* (contact inhibition) bezeichnet (Ross 1969). Infolgedessen werden Hautdurchleitungen von an ihnen herabwachsenden, nicht keratinisierten Epidermiszellen umgeben, wodurch ein sinusartiger Raum entsteht. Dieser auch *Marsupialisation* genannte Vorgang ist ein regelmäßig zu beobachtender Prozess bei Hautdurchleitungen (Hall, et al. 1975; Holgers, et al. 1994; Winter 1974). Eine Ausnahme davon bilden die Zähne. Eine Hypothese besagt, dass hier die Epidermis durch dichte kollagene Brückenbildungen zwischen Zähnen und periodontaler Membran an einem Herabwachsen gehindert wird. Eine fibröse Einkapselung kann nur durch die Verwendung von bioinerten Werkstoffen minimiert werden (Williams 1987).
- Prozesse der Wundheilung und Zellreifung erzeugen Kräfte, die an der Grenzfläche Implantat-Umgebungsgewebe einwirken (Hall, et al. 1984) und klinisch zur *Extrusion* führen können (Becker, et al. 1983).
- Im Falle der Unmöglichkeit, Fremdkörper zu verdauen, wie das bei Implantaten der Fall ist, kommt es zu einer chronischen Entzündung (Nühlen und Große-Siestrup 1992).

1.6 Werkstoffe

Nach WILLIAMS sind „Biomaterialien... Werkstoffe, die in der Human-, Zahn-, und Veterinärmedizin oder pharmazeutisch angewandt werden und die in unmittelbaren Kontakt mit dem Körpergewebe gelangen und gewöhnlich (jedoch nicht ausschließlich) in dieses implantiert werden“ (Williams 1987; Wokalek 1988).

Die Wechselwirkungen zwischen lebenden und nicht lebenden Systemen bieten die Grundlage für die Termini „*Biomaterial*, *bioaktives Material* und *Gewebebindung*“ (Gross

1993). Biowerkstoffe lassen sich nach unterschiedlichen Kriterien klassifizieren. WILLIAMS nahm eine Einteilung der Biomaterialien anhand ihrer klinischen und zeitlichen Verwendung vor (Williams 1976). Hierbei unterschied er folgende vier Kategorien:

- Extrakorporale Vorrichtungen, bei denen es zum Kontakt von Werkstoff und Blutbestandteilen kommt.
- Anwendungen, die eine nur vorübergehende Funktion erfüllen und daher kurzfristig im Körper verbleiben.
- Materialien, die über eine längere Zeitspanne zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken inkorporiert werden.
- Vorrichtungen, die permanent und vollständig in den Körper implantiert werden, wobei entweder erkranktes oder verletztes Gewebe oder die Funktion eines fehlenden oder dysplastischen Organes ersetzt und übernommen wird; hierzu zählen auch Materialien zur Korrektur von Deformitäten und zur Elektrostimulation von Muskel- und Nervengewebe.

Andere Einteilungen von Biomaterialien berücksichtigen ihre chemische Zusammensetzung (Helmus und Hubbell 1993).

Die zur Verankerung extra- und intraoraler Implantate standardmäßig verwendeten, polierten Brånemark-Abutments (Distanzhülsen) bestehen aus Reintitan. Zur Materialoptimierung werden die Oberflächen mittels Kugelstrahlen verdichtet, wodurch die Oberflächendruckspannungen erhöht werden. Dies führt zu verbesserter Materialfestigkeit. Die Distanzhülsen sind diskret überdreht und zeigen daher eine Riefung (Ergebnis einer Materialstudie an der Technischen Universität Berlin).

Titan weist an seiner Oberfläche eine typische Abfolge von Oxidation und Hydrolyse auf. Infolge der niedrigen Bindungsenthalpie von TiO_2 ist Titan stets von einem Oxidbelag bedeckt (Abb. 7). Bei Feuchtigkeitskontakt brechen diese Oberflächenbindungen auf und es entsteht eine Hydroxylionenoberfläche.

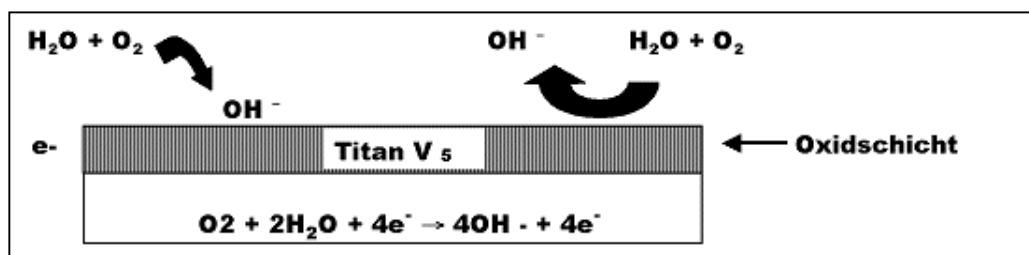


Abb. 7: Abfolge von Oxidation und Hydrolyse auf einer Titanoberfläche

Titan gilt als gut bioverträglich und weist eine gute Resistenz gegen Korrosion auf (Albrektsson, et al. 1983). Als Implantatwerkstoff besitzt Titan im Verbund mit Knochen offensichtlich günstige Oberflächeneigenschaften, im Bereich der Haut respektive des Weichgewebes gelingt die Integration des Titan-Implantats in das umgebende Weichgewebe jedoch nur mangelhaft.

1.7 Biokompatibilität und –funktionalität

Als Folge des sehr unterschiedlichen Einsatzes anders- oder gleichartiger Werkstoffe zwischen den verschiedenen medizinischen Fachrichtungen wurde in der Vergangenheit der Terminus „*Biomaterial*“ uneinheitlich definiert. Die Europäische Gesellschaft für Biomaterialien legte 1991 auf der Zweiten Consensus Conference folgende Definition fest: „Ein Biomaterial ist ein Material, das mit biologischen Systemen ein Interface (Kontaktfläche) bilden soll, um Gewebe, Organe oder Körperfunktionen zu bewerten, zu behandeln, zu verstärken oder zu ersetzen (a material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body)“ (Williams 1987; Williams 1992).

Bei dieser Definition steht allerdings die „*Biofunktionalität*“ im Vordergrund, wohingegen die Biokompatibilität eines Werkstoffes von vorrangiger Bedeutung ist. Der Begriff *Biokompatibilität* bezeichnet die Eigenschaft eines Implantates, bei seiner Anwendung eine angemessene Antwort des Empfängers hervorzurufen (Remes und Williams 1992). J. BLACK nahm 1991 auf der Zweiten Consensus Conference der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien eine Einteilung von Biomaterialien anhand der geschichtlichen Entwicklung bezüglich Bewertung und Anforderungen an derartige Werkstoffe vor (Black 1992). Demnach bestand in der Anfangsphase die Forderung nach „inerten“ Materialien, welche nicht toxisch sind, für die Dauer ihres Einsatzes unverändert (inert) bleiben und keine Immunantwort im Wirtsorganismus hervorrufen. Angesichts der Tatsache, dass kein Biowerkstoff einer solchen Forderung gänzlich genügen kann, rückte der Begriff der „Biokompatibilität“ in den Blickpunkt des Interesses.

In letzter Zeit nun richtet sich das Augenmerk auf sog. „lebensfähige“ Biomaterialien (*interaktive Biomaterialien*), die aus vitalen und avitalen Komponenten bestehen. Die *Implantat-Wirt-Beziehungen* werden seither eingehender analysiert, wobei nach

Substanzen gesucht wird, die das Biosystem selbst produziert - beim Patienten beispielsweise unter Zuhilfenahme von in-vitro-Zellkulturen. Vermutlich lässt sich durch Hydrogelbeschichtung von Implantatoberflächen eine verbesserte Implantat-Gewebe-Integration erreichen. Hierbei kann Gewebeflüssigkeit in das Implantat penetrieren, wodurch der Fremdkörper für das umgebende Biosystem undefinierbarer erscheint (Bakker, et al. 1988; Blitterswijk, et al. 1991).

Hinsichtlich der Anforderungen an ein Biomaterial werden eine Struktur- von einer Oberflächenverträglichkeit unterschieden. Die *Strukturverträglichkeit* beschreibt die Anpassung aller auf der Materialstruktur beruhenden Eigenschaften an das Biosystem bzw. die Übertragung von Kräften. Demgegenüber charakterisiert die *Oberflächenkompatibilität* eine Anpassung der Eigenschaften einer Implantatoberfläche an die nächstbenachbarten Zellen (Schmidt 1999; Wintermantel, et al. 1999). *Die Oberfläche ist stets biologisch reaktiv und grundsätzlich anders als ihr Kern.*

Das Design und die Auswahl eines speziellen Biomaterials wird in Abhängigkeit von der Betrachtungsweise, ob medizinisch oder naturwissenschaftlich, und im Hinblick auf seine Anwendung bestimmt: Während beispielsweise im Bereich der Haut Materialeigenschaften gefordert werden, die eine gute Anhaftung der Zellen ermöglichen, sollen sich dahingegen bei intravaskulären Kathetern keine Zellen anlagern (Helmus und Hubbell 1993).

Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Fremdmaterial und Biosystem unter Einbeziehung des Immunsystems werden folglich unter dem Begriff Biokompatibilität subsummiert (Klinkmann und Falkenhagen 1989). Wiederholt wurde postuliert, dass dieselbe Immunantwort, mit der sich der Körper gegen fremde Organismen verteidigt, auch durch Biomaterialien hervorgerufen werden kann. Biomaterialien sind jedoch weder lebende noch nicht lebende Organismen, weshalb die Gewebeantwort auf Biomaterialien nicht eindeutig diesen natürlichen Abwehrmechanismen entsprechen muss. Jedoch können diese Abwehrmechanismen verschiedene Komponenten und Prozesse des Immunsystems in Gang setzen, die mit dem Implantat wechselwirken (Remes und Williams 1992). Zellen und Mediatoren des Immunsystems können regelmäßig im Umgebungsgewebe von Implantaten nachgewiesen werden (Holgers, et al. 1992). Diese Agenzien haben wesentlichen Einfluss auf die Bioverträglichkeit und –funktionalität und damit auf die Lebensdauer von Implantaten.

1.8 Oberflächentopographie

Die Mikrotextur von Fremdkörperoberflächen beeinflusst entscheidend das Wachstums- und Adhäsionsverhalten von Zellen und folglich auch die Integration eines Implantates in das Umgebungsgewebe. Spezifische Oberflächencharakteristika, insbesondere solcher Werkstoffe, die keine oder eine nur geringe biologische Aktivität entfalten, bestimmen die Gewebeantwort (Recum, et al. 1996).

HARRISON beschrieb im Jahre 1911 erstmals die Bedeutung der *Oberflächentopographie*, die zu einem Orientierungseffekt bei adhärennten Zellen führt (Harrison 1911). Er kultivierte verschiedene Zellspezies auf Spinnweben und beobachtete, dass Bewegung, Form und Anordnung der Zellen von diesem Oberflächenmuster beeinflusst wurden. In weiteren Experimenten analysierte WEISS, der den Begriff der *Kontaktführung* („contact guidance“) einführte, die Zellreaktion auf einem fibrillären Exudat und konnte eine Ausrichtung der Zellen entlang der Fasern nachweisen. Er folgerte daraus, es müsse ein submikroskopisches Exudat für dieses Zellverhalten verantwortlich sein (Weiss 1934; Weiss 1945). Erst 1976 konnten DUNN und HEATH das Postulat eines submikroskopischen Exudats widerlegen (Dunn und Heath 1976).

Fibroblasten und Epithelzellen sind in der Lage, sich an subzellulären Strukturen einer Werkstoffoberfläche auszurichten (Curtis und Clark 1990). Auf gerillten Oberflächen, insbesondere auf Texturen im Mikrometerbereich, zeigen Fibroblasten das Phänomen der *Kontaktführung* (Singhvi, et al. 1994). Dies bedeutet, dass sich die Zellen in Richtung der Rillen orientieren und ausbreiten (Walboomers, et al. 1999). Eine erste Erklärung hierfür könnte der innige Kontakt zwischen Zelle und Substrat via *fokale Adhäsionen* sein (Walboomers, et al. 1998). Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass fokale Adhäsionen an den Kämmen der Rillen anzubinden und sich an diesen auszurichten vermochten. In diesen Studien fanden sich keine Unterschiede bezüglich des gemessenen *Grades der Zellorientierung* innerhalb verschiedener Rinnen. Allerdings lagen die auf 1 bis 2µm großen Rillen kultivierten Fibroblasten auf den Kämmen, während bei 5 bis 10µm durchmessenden Rillen die Zellen in die Rillen hinabzusteigen schienen. WALBOOMERS et al. folgerten aus ihren Beobachtungen, dass das Zusammenbrechen von Zellformationen und die Anordnung fibröser, zellulärer Komponenten, insbesondere der Filopodien, wesentlich von den Mikrorillen beeinflusst werden.

CLARK und Mitarbeiter wiesen nach, dass auf gerillten Oberflächen das *Ausmaß der Zellreaktionen* mit der Rillentiefe und -breite und vermutlich auch mit der Anzahl der angrenzenden Rillen korreliert (Clark, et al. 1990). Schon eine Rillentiefe von 130nm an einer Oberfläche genügte, um eine Ausrichtung der Zelle hervorzurufen (Clark, et al. 1991). In verschiedenen Experimenten mit Schweinehautepithelzellen und Gingivaexplantaten wies auch BRUNETTE eine Zellorientierung auf Oberflächen mit Rillenmustern nach (Brunette 1986). Bei weiteren Experimenten mit humanen gingivalen Fibroblasten zeigte sich eine strenge Orientierung zur Längsachse eines subzellulären Rillenmusters (Meyle, et al. 1994). POLANSKI et al. dokumentierten, dass sich die Zellen an Oberflächen mit 1µm durchmessenden Poren anheften und in diese Membranfortsätze verschieben können (Polanski, et al. 1984). Fibroblasten und Epithelzellen orientieren sich nicht nur an Oberflächenkonturen, sondern passen sich strukturierten Substraten in vitro und in vivo an (Meyle, et al. 1991). Die Ursachen für dieses Verhalten sind nicht bekannt.

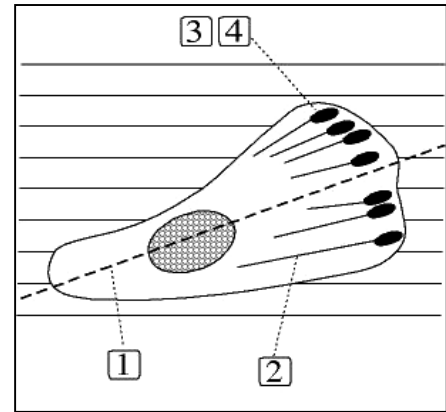
Das *Phänomen der Anpassung* an die Oberflächentopographie ruft höchstwahrscheinlich die Ausrichtung der gesamten Zelle hervor und kann möglicherweise zur gezielten mikromechanischen Verankerung permuköser, intraoraler Implantate genutzt werden (Meyle, et al. 1994).

Als *fokale Adhäsionspunkte* werden harte, rechtwinklige Strukturen bis zu einer Größe von 10µm betrachtet (Burridge, et al. 1988). Falls die Rillen kleinere Ausmaße haben, sind die fokalen Adhäsionspunkte einzig in der Lage, sich auf den Kämme ausgerichtet selbst zu berühren. Sobald die fokalen Adhäsionen ausgerichtet sind, können sich Aktinfilamente (Vinculin) und somit auch die gesamte Zelle daran orientieren (Dunn und Brown 1986; Ohara und Buck 1979).

CHEHROUDI et al. stellten in Tests mit horizontal und vertikal gerillten Oberflächen eine epitheliale Wachstumshemmung auf den horizontal gerillten fest, während es auf den vertikal gerillten zu gesteigertem Wachstum der Epithelzellen kam. Bei diesen Untersuchungen überbrückten die Epithelzellen 22µm tiefe Rillen und schienen an ihrer Fortbewegung durch die an der Implantatoberfläche haftenden Fibroblasten gehindert zu werden. Im Gegensatz dazu wurde das epitheliale Wachstum an den flacheren, horizontalen Rillen durch Kontaktführung behindert, da hier keine orientierte Fibroblastenhaftung an der Implantatoberfläche erkennbar war (Chehroudi, et al. 1990). Allerdings unterliegt die Orientierungsreaktion der Zellen einer recht großen Zufallskomponente, insbesondere bei abgeflachten Furchen (Clark, et al. 1990).

Abb. 8:

Schemazeichnung eines Fibroblasten auf mikrotexturierter Oberfläche: 1) Längsachse der Zelle in Beziehung zur Richtung der Rillen, 2) Längsachse der Aktinfilamente in Beziehung zur Richtung der Rillen, 3) Richtung der fokalen Adhäsionen in Beziehung zur Richtung der Rillen, 4) Position der fokalen Adhäsionen in Beziehung zum Substratmuster (nach Walboomers et. al. 1998).



Allerdings kommen verschiedene Analysen des Orientierungsgrades von Zellen an Oberflächen zu teilweise erheblich unterschiedlichen Ergebnissen. CLARK et al. schlugen daher vor, Zellen einzig dann als orientiert zu betrachten, wenn die Längsachse der Zellen in einem Winkel von $0-10^\circ$ zur Längsachse der Rillen verläuft (Clark, et al. 1990). Null Grad gelten im Allgemeinen als perfekte Zellausrichtung, wobei die mittlere Zellausrichtung zugrunde gelegt wird (Abb. 8). In den meisten Fällen ist die Zellorientierung derart offensichtlich und ausgeprägt, dass die Zellen einzig zwei Pseudopodien an ihren einander gegenüberliegenden Polen ausbilden (Curtis und Wilkinson 1997).

Des Weiteren bedingen Oberflächenmerkmale den Grad der *Benetzbarkeit* (*wettability*) bzw. die *Oberflächenspannung* (dyn/cm ($1\text{dyn}=10^{-5}\text{N}$)) einer Werkstoffoberfläche (Baier und Meyer 1988). Ganz sicher besteht eine Korrelation zwischen kritischer *Oberflächenspannung* und der Fähigkeit einer Zelloberfläche, die Zelladhäsion zu unterstützen (Abb. 9). Beispielsweise werden keine Blutplättchen abgeschieden an Materialien, die dem Blut ausgesetzt sind, sobald die Oberflächenspannung auf Werte zwischen $20-30 \text{ dyn cm}^{-1}$ abfällt; Zelladhäsion und -ausbreitung befinden sich dann auf einem Minimum (Jauregui 1987).

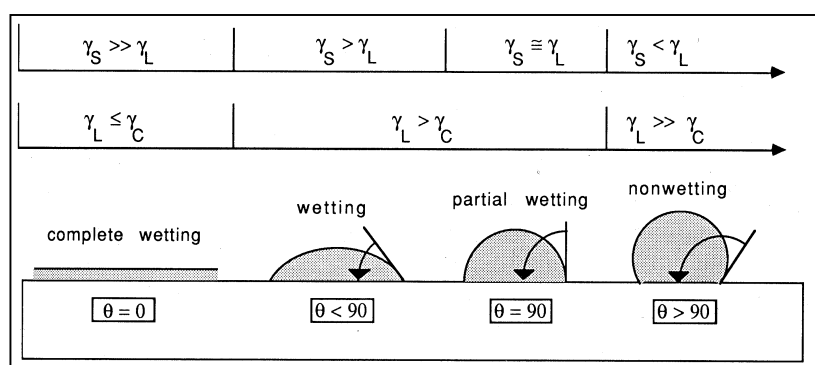


Abb. 9: Beziehung zwischen der Oberflächenbenetzung, dem Kontaktwinkel (θ), der Oberflächenspannung (γ) des Substrats (S) u. der Flüssigkeit (L) sowie der kritischen Oberflächenspannung (C)

Ist die Oberflächenspannung eines Festkörpers (σ_s) größer als die Summe aus Grenzflächenspannung ($\gamma_{s,f}$) und Oberflächenspannung der Flüssigkeit (σ_f), so beträgt der Kontaktwinkel (ϑ) Null, d.h. die Materialoberfläche ist komplett benetzbar.

BAIER und Mitarbeiter untersuchten glatte Implantatoberflächen mit unterschiedlichen Oberflächenspannungen und konnten an Oberflächen mit hoher Energie einen dreifachen Anstieg von fibroblastisch-fibrozytischen Zellen an den zuvor peinlichst gereinigten Implantaten nachweisen. Diese Zellen zeigten eine abgeflachte Gestalt und produzierten zähe Bandstrukturen, die durch eine dünne, eiweißreiche voradsorbierte Membran verliefen. Im Gegensatz dazu waren die Implantate mit niedriger Oberflächenspannung, wie für dentale Implantate typisch, von einer zellarmen, nicht haftenden fibrösen Kapsel eingemauert (Baier, et al. 1984).

Die Arbeitsgruppe um DEN BRABER untersuchte silikonbeschichtete glatte und gerillte Oberflächen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden. Hierdurch wurde die Oberflächenenergie und vermutlich auch die Proteinadsorption beeinträchtigt. DEN BRABER kam zu dem Schluss, dass physikochemische Parameter wie *Oberflächenenergie* und *Oberflächenspannung (wettability)* zwar das Zellwachstum beeinflussen, jedoch keinen messbaren Einfluss auf Zellform und -orientierung an mikrostrukturierten Oberflächen ausüben (den Braber, et al. 1995). Diese Ergebnisse deuten an, dass die *Oberflächenchemie* bei topographischen Zellphänomenen eine nur untergeordnete Rolle spielen (Curtis und Wilkinson 1997). Entscheidende Einflussgrößen für die Zellorientierung sind vielmehr Tiefe und Breite der Rillenmuster (Weiss 1945).

Die Frage, ob Zellen mehr auf chemische denn auf topographische Signale bzw. Reize reagieren, ist eine oft gestellte Frage. BRITLAND und Kollegen konnten in Untersuchungen mit Laminin als chemischem Effektor an Oberflächen nachweisen, dass Zellen bei einer Rillentiefe von 500nm(10^{-9} m) oder mehr überwiegend auf topographische Reize reagieren, wohingegen bei geringerer Rillentiefe der chemische den topographischen Aktivierungsreiz überlagert. Bei einer Rillentiefe von 5 pm(10^{-12} m) machte der chemische Reiz auf die Zellen 80% und der topographische nur noch 7% aus (Britland, et al. 1992; Britland, et al. 1992).

CURTIS und Mitarbeiter erfanden eine Art Falztechnik, mit der sie äußerst kleine Areale chemisch unterschiedlich behandelter Substanzen auf einer Zelle untersuchen konnten. Obschon die chemischen Reize die Zellen zu vermehrter Neuritenbildung anregten,

führten sie nicht zu polarisierter Ausdehnung oder anderen erkennbaren Zellreaktionen, die topographisch ausgerichteten Reaktionen entsprachen. Jedoch musste der vermehrten Adhäsion und Ausbreitung der Zellen ein Aktivierungsfaktor seitens der Kontaktstelle an der Implantatoberfläche zugeschrieben werden, welcher eine Fibronectin-unabhängige Adhäsion ermöglichte (Curtis, et al. 1992).

Tab. 1: Zur Oberflächenmodifikation geeignete Werkstoffe (Curtis und Wilkinson 1997):

Elemente:	Anorganische Verbindungen:	Polymere:
Gold	Silikon	Polymethylmethacrylate
Titan	Lithiumniobate	Silikone
Silikon (oxidierte Oberflächen)	Silikonnitrit	Epoxy (nicht spezifiziert)
Karbon (Diamante und diamantartige Materialien)		Polydioxanone
		Nylon
		Zelluloseazetat
		Polyimide
		Kollagen
		Fibrin

Das Zytoskelett ist nicht statisch, sondern zeigt eine dynamische Struktur (Banes, et al. 1995). Äußere Kräfte werden über die fokalen Adhäsionspunkte an das Zytoskelett weitergeleitet. Die Zellen streben hierbei einen Zustand an, in welchem sich innere und äußere Kräfte in einem für die Zelldifferenzierung günstigen Gleichgewicht befinden (Ingber 1993; Ingber 1994). Auf mikrogerillten Substanzen kultivierte Zellen können Kraftmustern ausgesetzt werden, in welchen das Gleichgewicht einwirkender Kräfte ausgerichtete bzw. orientierte Zellformen induziert.

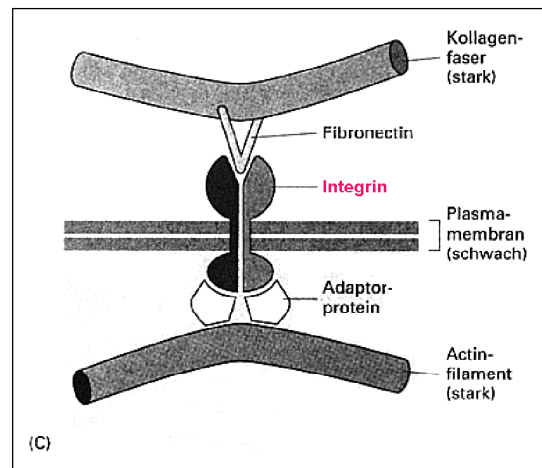
1.9 Zelladhäsion an azellulärer und zellulärer Materie

Die Integrität der Gewebe, die Platzierung der einzelnen Zellen an der richtigen Position während der Embryogenese und die bakterielle Besiedlung werden wesentlich von Adhäsionsphänomenen bestimmt (Grinnel 1978). Die Charakterisierung von Rezeptoren für die Adhäsion der Zelloberflächen ist ein wichtiges Hilfsmittel, um unterschiedliche Bedingungen, welche die Zelladhäsion beeinflussen, zu untersuchen. Serum- oder Gewebeproteine unterstützen nicht bloß passiv den Adhäsionsprozess, vielmehr besitzen sie Areale, mit denen sie nach Art einer Antigen-Antikörper- oder Enzym-Substrat-Bindung an spezifischen *Oberflächenrezeptoren* der Zellen andocken können.

Die Zelloberflächen bestehen zum Teil aus Proteinen, was vermuten lässt, dass Zelladhäsionen überwiegend über Protein-Protein-Interaktionen zustande kommen (Curtis und Forrester 1984; Curtis und Forrester 1984). Die aktive Zelladhäsion an extrazellulären Matrixproteinen oder an verschiedenen Substraten wird durch Rezeptoren der Integrinfamilie vermittelt (Desmouliere und Gabbiani 1996).

Integrine (Abb. 10) sind heterodimere Zelloberflächenrezeptoren, die eine Verbindung zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix herstellen können (Ruoslahti 1991) und als Signalvermittler bei Migrationsprozessen agieren (Scharffetter-Kochanek, et al. 1992).

Abb. 10: Integrin; aus: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, B. Alberts et al. 1999



Daneben kann auch eine passive Zelladhäsion in austrocknenden Wundflächen auftreten. Diese ist zum Teil das Ergebnis einer Proteinkonzentrierung z.B. an der Grenzfläche Verband/ Wunde, wo eine Art visköser Leim, der die Anhaftung verursacht, entsteht (Scales und Winter 1961).

Haftungen zwischen Zellen treten immer dann auf, wenn ein Zellkontakt hergestellt ist und zwei einander gegenüberliegende Zellareale dicht genug beieinander liegen. Dicht genug meint hierbei die einwirkenden Adhäsionskräfte. Es wird angenommen, dass bei Adhäsionsprozessen ein Gleichgewicht zwischen *elektrostatischen* Kräften, welche geladene Teilchen getrennt halten, und entgegenwirkenden *van-der-Waal-Kräften* besteht (Weiss 1970). Die *Adhäsionsarbeit* ist die Differenz der je Flächeneinheit gewonnenen zur aufgewandten freien Energie. Sind die beiden in Kontakt gebrachten Körper miteinander identisch, dann entsteht keine neue Grenzfläche, und die hierbei gewonnene Energie wird als *Kohäsionsarbeit* bezeichnet.

Es werden überwiegend drei Formen der *Bioadhäsion* beobachtet (Manly 1970):

- Zell-zu-Zell-Adhäsion, eine Voraussetzung für die Gewebeorganisation,
- Adhäsion zwischen vitalen Geweben und avitalen Komponenten eines Organismus,
- Adhäsion zwischen Geweben und Fremdkörperoberflächen.

Die Oberflächentextur eines Implantats kann das Zellverhalten durch Adsorption eines *extrazellulären Matrixproteins (ECM)*, welches von den Zellen produziert wird, beeinflussen. Nach diesem Adsorptionsvorgang können sich die Zellen an die adsorbierten ECM-Proteine anheften. Hierbei wird die Zusammensetzung und Anordnung der Zellen auf dieser Proteinschicht von den Oberflächenmerkmalen des jeweiligen Werkstoffes bestimmt (Walboomers, et al. 1998; Wintermantel, et al. 1999). Es kann jedoch zu einem buchstäblichen Wettlauf zwischen erwünschten und unerwünschten Zellspezies kommen, da die ECM-Proteine wie das Kollagen nicht nur erwünschte, sondern auch unerwünschte Zellen zur Adhärenz stimulieren. So kann beispielsweise Fibronectin die Adhärenz von *Staphylococcus aureus* an Werkstoffoberflächen verstärken (Gristina 1987) (Holgers, et al. 1994).

Das Ergebnis einer bakteriellen Oberflächenbesiedlung von Fremdkörpern ist die Bildung eines haftenden Films (Biofilm) (An und Friedman 1998). Dieser konstituiert sich aus einer organischen Matrix, in welche die Bakterien eingebettet sind. Diese Calyx besteht aus einem Polysaccharid-*Exopolymer*, der von den Bakterien gebildet wird, wenngleich auch vom Wirtsgewebe produzierte Substanzen in der Umgebung der Organismen vorhanden sein können (Tsiboulakis, et al. 1999).

Organismen können Implantate besiedeln, wenn ihre Exopolymere mit den Oberflächen kompatibel sind. Gewöhnlich werden Adhäsionsvorgänge durch die vorher ablaufende Oberflächenadsorption organischer Substanzen gefördert. Ein Werkstoff ist in wässrigen Lösungen bereits nach wenigen Minuten von einer Proteinschicht, die als „Haftvermittler“ für die Zellen dienen können, überzogen (Schmidt 1999). Bakterien sind jedoch auch in der Lage, ihre Anhaftungsstrategien an die spezifischen Besonderheiten einer Oberfläche anzupassen. Sobald eine bakterielle Besiedlung stattgefunden hat, sind weitere Bildung und Wachstum des bakteriellen *Biofilms* vom Material unabhängig. Dieser Biofilm schützt die Bakterien zusätzlich vor antimikrobiellen Substanzen. Die mikrobielle Anhaftung ist die Voraussetzung für eine Implantat-entzündung.

1.10 Radio frequency glow discharge

Eine Möglichkeit, die frühe Bildung eines solchen Biofilms zu verhindern, ist die Behandlung von Oberflächen mit der sog. „Radio-frequency-glow-discharge–“ (RFGD)–Methode (Baier und Meyer 1988; Baier, et al. 1984; Weiss 1964). Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es nicht nur möglich, Implantatoberflächen zu sterilisieren und zu reinigen, sondern auch ihre Oberflächenenergie zu erhöhen, was zu verbesserter Adhäsivität der Werkstoffoberflächen führt.

BINON et al. stellten an dentalen Titanimplantaten, die mit dem RFGD-Verfahren vorbehandelt wurden, die dünnste Oxidschicht und die sauberste Oberfläche fest (Binon, et al. 1992). BAIER et al. wiesen bei anorganischen Oberflächen, die mit der RFGD-Technik vorbehandelt wurden, eine verstärkte Fibroblastenadhäsion nach (Baier, Meyer et al. 1984). Ebenso konnten WALBOOMERS et al. in einer Studie des Adhäsionsverhaltens von Fibroblasten auf standardisierten Texturen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften aufzeigen, dass es auf allen Werkstoffen, die mit dem RFGD-Verfahren vorbehandelt waren, zu einem exponentiellen Zellwachstum kam. Auf den nicht vorbehandelten Materialien kam es hingegen zu einer verzögerten Proliferation (Walboomers, et al. 1999).

Der Plasmazustand eines Gases wird als vierter Aggregatzustand bezeichnet (Niedrig 1992). Er unterscheidet sich durch das Auftreten frei beweglicher Ladungsträger von den anderen drei Aggregatzuständen. Plasmen sind hochionisierte Gase, die sich als Gemisch von Neutralgas, Elektronengas, Ionengas, Gas angeregter Atome und Lichtquantengas aufteilen lassen. Das RFGD (Radio Frequency Glow Discharge) ist ein kaltes Plasma, das bei Zimmertemperatur und Unterdruck erzeugt werden kann. Typische Gastemperaturen liegen zwischen 25 und 60 Grad Celsius und einem Druck von 0,03 und 0,14 Pa (Ratner, et al. 1996). Durch den hochfrequenten Energieeintrag entsteht eine Elektronenlawine, die das verwendete Gas in den Plasmazustand überführt.

Es ist möglich, unterschiedliche Gase einzusetzen. Beim Plasmaätzen mit Argon, Neon, Stickstoff, Luft und Wasserdampf können folgende Reaktionen an der Materialoberfläche auftreten: 1.) Befreiung der Materialoberfläche von Verunreinigungen, 2.) Entfernung von Atomen und Molekülen an der Oberfläche, 3.) Entstehung von Quervernetzungen, 4.) Aufrauung der Oberfläche, 5.) Bildung oder Oxidation reaktiver Gruppen und 6.) Erzeugung freier Radikale oder Peroxide an der Oberfläche.

1.11 Vielschrittige Gestaltwandlung und kontaktinduzierte Zellspreitung

Die Zelladhäsion ist ein dynamischer Vorgang. Während des Adhäsionsvorganges vollzieht sich ein dramatischer, licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbarer Wandel von einer runden bis zu einer flach ausgebreiteten Zellform (Abb. 11). Der Vorgang der Zellanhaftung vollzieht sich hierbei in mehreren, im Einzelnen und biochemisch unterscheidbaren Schritten, *Multistep Paradigm* genannt (Grinnel 1978):

- *Adsorption*: Während die Zellhaftung an eiweißfreien Substraten ein unspezifischer und von der metabolischen Aktivität und dem Entwicklungszustand der Zellen unabhängiger Prozess ist, wird die Adhäsion an proteinbeschichteten Substraten von der Zellphysiologie bestimmt und beschränkt sich auf eine begrenzte Gruppe adsorbierter Proteine.
- *Contact*: Zellkontakt mit dem Substrat; da Zellen bei einem physiologischen pH-Wert negativ geladene Oberflächen haben und die Oberflächen der meisten Substrate ebenfalls negativ geladen sind, besteht zwischen beiden eine elektrostatische Barriere, die von zytoplasmatischen Mikroausstülpungen (*Filopodien*) überwunden bzw. durchbrochen werden muss, um eine Adhäsion zu ermöglichen. Durch die Ausbildung von Filopodien beginnt die Zelle abzuflachen.
- *Attachment*: Ausbildung fokaler Adhäsionen, welche an proteinbeschichteten Substraten von Ligand-Rezeptor-artigen Interaktionen gesteuert wird.
- *Spreading*: Zellausbreitung, welche nach Anhaftung der Filopodien am Substrat als zunehmende Abflachung der Zelle imponiert, mit dem Resultat einer ansteigenden Festigkeit der Zellanhaftung. Hierbei ist die *aktive* Spreitung, gekennzeichnet durch Ausbildung von Filopodien, von der *passiven* zu unterscheiden, bei der sich die Zellen ausgehend von ihrer Kontaktstelle auf dem Substrat kontinuierlich abflachen und ausbreiten (Grinnel, et al. 1977).

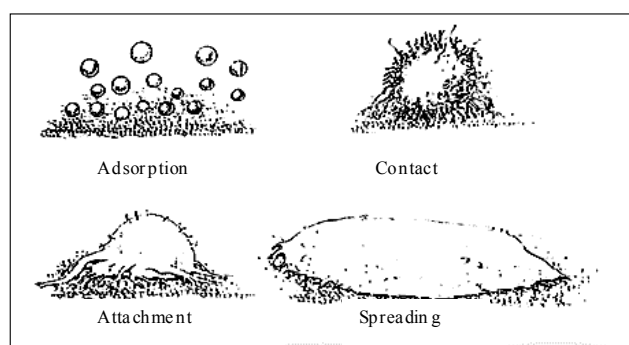


Abb. 11: Adhäsionsvorgang, aus Grinnel: Cellular Adhesiveness and Extracellular Substrata (1978)

Zur Ermöglichung der Zellbewegung muss sich ein neuer Teil der Zellmembran auf der Seite der Bewegungsrichtung mit dem Substrat verbinden, wobei Aktinfilamente des Zytoskeletts in dieses Kontaktelement einbezogen werden.

1.12 Vermeidungsstrategien von Implantatkomplikationen

Es existieren verschiedene prophylaktische Ansätze bei der Therapie und Werkstoffherstellung, welche die Häufigkeit periimplantärer Entzündungen reduzieren helfen:

- Mittels einer entsprechenden Operationstechnik wird periimplantär ein subkutan ausgedünntes, immobiles und direkt dem Periost aufliegendes Hautareal angestrebt (Klein, et al. 1998). Gute Funktionszeiten werden beschrieben, wenn die Haut nur gering gegen die knöcherne Unterlage verschieblich ist (Albrektsson, et al. 1983; Albrektsson, et al. 1981). Hierdurch werden mechanische Irritationen und Relativbewegungen zwischen der Haut und subkutanen Strukturen, die ein Abreißen der an der Implantatoberfläche haftenden Haut verursachen, vermieden. Als *Stressreduktionszone* wird der Konstruktionsteil eines hautdurchgeleiteten Implantates bezeichnet, der über eine innige Verbindung zum subepithelialen Bindegewebe die Beweglichkeit des periimplantären Hautbezirks minimiert.
- Überdies wird der Patient zur optimalen periimplantären Hygiene angehalten (Menneking, et al. 1998). Die nicht vorhandene Haftung der Haut an den vom Hersteller gelieferten Titan-Abutments mit glatter Oberfläche ist allerdings klinisch nicht beeinflussbar.
- Unterschiedliche physikochemische und geometrische Eigenheiten von Materialoberflächen können dazu genutzt werden, die begleitende Gewebereaktion zu beeinflussen. Es wird angestrebt, Biomaterialien herzustellen, die eine spezifische Gewebeantwort hervorrufen und dadurch zu einem einheitlichen Heilungsprozess führen (Williams 1987).

Das „ideale“ Biomaterial bewirkt einerseits die minimalste Zellanregung und infolgedessen die geringste Ausbildung einer Fibrinkapsel. Das bedeutet andererseits, dass das Implantat vom Umgebungsgewebe ignoriert wird. Im Idealfall wird jedoch eine Wechselwirkung zwischen den Zellen und dem Werkstoff angestrebt, wobei das Epithel aktiv einwächst (Schmidt 1999).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Neben den Materialeigenschaften (physikalische und chemische Merkmale, Oberflächentopographie) sind bei der Testung von Werkstoffen für Hautdurchleitungen die lokalen Reaktionen im Umfeld eines Implantates bedeutsam. Von oberflächenmodifizierten Werkstoffen verspricht man sich eine verbesserte Implantatintegration und folglich eine bakteriendichtere Versiegelung. Hierbei ist insbesondere das spezifische Haftungsverhalten einzelner Zellspezies (Keratinocyten/Fibroblasten) an den unterschiedlichen Oberflächentexturen zu berücksichtigen. Die dabei ablaufenden Prozesse sind komplexer Natur und sollen, um ein weitgehend von Störgrößen freies und standardisiertes Modell zu ermöglichen, einzeln analysiert werden (Sauberlich, et al. 1999). Die Untersuchung eines Teilsystems wie beispielsweise kultivierter und/ oder perfundierter Haut oder der Einsatz von Zellkulturmodellen ist grundsätzlich möglich. Überdies wird angestrebt, die Anzahl erforderlicher Tierversuche durch die Anwendung von Zellkulturmethoden zu begrenzen.

Wurde in einer vorangegangenen Studie das Adhäsionsverhalten von Keratinocyten an verschiedenartig oberflächenmodifizierten Titan-Hülsenimplantaten untersucht (Klein, et al. 2000), so soll nun die Fibroblastenadhäsion und –proliferation an gleichartigen Titan-texturen mit Hilfe eines eigens zu diesem Zweck entwickelten Zellkulturmodells analysiert werden. Demnach konzentriert die Studie ihre Analyse auf die Gewebe-Implantat-Schnittstelle auf Ebene der *Dermis*.

Während der Keratinozyt als Grundbaustein der Epidermis fungiert, ist der Fibroblast das vorherrschende Zellelement im darunterliegenden Bindegewebe. Beiden kommt die Aufgabe zu, die Kutis an der Grenzfläche Implantat-Umgebungsgewebe auf unterschiedlichem Niveau zu versiegeln.

Es existiert die Hypothese, dass sich das Tiefenwachstum des Epithels infolge ausbleibender Kontaktinhibition der Keratinocyten durch reife, kollagene Bindegewebsfasern verhindert lässt (Brunette und Chehroudi 1999; Chehroudi, et al. 1990; Chehroudi, et al. 1991; Chehroudi, et al. 1989; Winter 1974). Das Herabwachsen des Epithels an den Distanzhülsen könnte demzufolge durch eine verbesserte bzw. vermehrte subepitheliale Fibroblastenhaftung verhindert werden.

Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob von einer qualitativen Beurteilung des Zellbewuchses auf den diversen Oberflächen Rückschlüsse auf den zu

erwartenden quantitativen Zellbewuchs möglich sind. Die Elektronenmikroskopie soll nicht nur der Kontrolle der Fibroblastenmorphologie und Dichte des Zellbewuchses dienen, sondern zugleich das von den Oberflächentexturen beeinflusste und zeitabhängige Wachstumsverhalten der Fibroblasten veranschaulichen.

Materialeigenschaften wie Benetzbarkeit und Elastizität können ebenso wie Oberflächentopographie (Art der Textur, Größe und Gestalt) das Zellverhalten beeinflussen. Daher werden die polierten Titan-Werkstoffe verschiedenartig chemisch und physikalisch oberflächenmodifiziert. Denn das Design eines idealen Implantats erfordert für jede Zellpopulation, mit welcher der Werkstoff in Berührung kommt, eine spezifische Oberflächentextur bzw. -topographie (Chehroudi, et al. 1990).

Die Auswahl von Biomaterialien erfordert jedoch den Kompromiss zwischen der für die Integration des Implantats in den Körper erwünschten Zell- und Gewebeadhäsion einerseits und der unerwünschten Adhäsion von Keimen auf der Implantatoberfläche andererseits.

Es existieren diverse Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation, wie beispielsweise Schaffung definierter Rauigkeiten, Belegung mit Sauerstoff, Oberflächenhydrolyse, Funktionalisierung von Ankergruppen (Amino-, Carboxylgruppen etc.), Funktionalisierung mit Peptiden, Beschichtung mit amorphem und kristallinem Hydroxylapatit, Aufrauhung oder Immobilisierung von Kollagen oder Veränderung der Oberflächenenergie. In Anlehnung an vorangegangene Untersuchungen und zwecks Vergleichs der Ergebnisse werden neben polierten Titanoberflächen vier bekannte und bereits erprobte Oberflächenmodifikationen (sandgestrahlte, glaskugelgestrahlte, Kollagen A-beschichtete und silikonbeschichtete) verwendet. Ergänzend wird das oben beschriebene Radio-frequency-glow-discharge-Verfahren bei der Hälfte aller oberflächenveränderten Werkstoffe angewandt, um so Vergleichswerte zu erhalten, die aufzeigen, ob und bei welchen Oberflächentexturen das RFGD-Verfahren zu einer verbesserten bzw. verminderten Fibroblastenadhäsion und –proliferation führt. Die gewonnenen Resultate sollen abschließend den Ergebnissen anderer Studien und der Pilotstudie von KLEIN und HOHLFELD, welche die Keratinozytenadhäsion und –proliferation an extraoralen Hülsenimplantaten untersuchten, gegenübergestellt und im Kontext mit der Fachliteratur diskutiert werden.

3 Material und Methode

3.1 Vorversuche

Während der Vorversuche wurde nach einem Modell gesucht, mit dem die Fibroblastenadhäsion und –proliferation an verschiedenartig modifizierten Titanoberflächen untersucht werden kann. Mittels Zählung der von den Implantaten abgelösten Fibroblasten kann auf das Adhäsions- und Proliferationsverhalten an den unterschiedlichen Werkstoffoberflächen rückgeschlossen werden. Daneben dienten die Vorversuche dem Erlernen der Zellkultivierung und dem Zweck, eine geeignete Zellzahl und Kultivierungsdauer zu ermitteln, unter der es zu optimalen Wachstums- und Adhäsionsbedingungen für die Fibroblasten in den Wells der 96er Mikrotiterplatten kommt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass Zellen metabolisch aktiv sind und fortwährend Stoffe und Mikroexudate in das Zellmedium und auf die Substratoberfläche sezernieren. Daher kann die Dauer eines Zellkulturversuchs infolge der Akkumulation synthetisierter Substanzen die intrinsische Zelladhäsion beeinflussen (Grinnel 1978).

Es wurden Mengen von 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 und 5.0 x 10⁴ Zellen/ ml verwendet. Die Kontrollen erfolgten jeweils nach 1, 2, 3 und 4 Tagen Kultivierungsdauer per Lichtmikroskopie und anschließender Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer. Das Nährmedium wurde einmal täglich gewechselt. Lichtmikroskopisch wurden insbesondere die Zellrasen neben den Titanplättchen bzw. auf den werkstofffreien Bodenflächen der Kontrollwells hinsichtlich Vitalität respektive Avitalität sowie Zelldichte und –verteilung beurteilt. Der Zellbewuchs ist allerdings auf den Titanplättchen mit Hilfe der Lichtmikroskopie nicht beurteilbar.

Kam es nach einer dreitägigen Kultivierung mit 2 x 10⁴ Zellen/ ml zum Phänomen der Überkonfluenz, d.h. zu einem Überwachsen der Zellen mit konsekutivem Nährstoffverbrauch, erkennbar an der Abnahme der ermittelten Zellmenge, war dahingegen nach einer nur zweitägigen Kultivierung mit gleicher Zellmenge ein lichtmikroskopisch gesunder, monolayerartiger Zellrasen erkennbar. Andererseits fanden sich bei Zellmengen von 0.5 x 10⁴ Zellen/ ml nur spärlich ausgebildete Zellrasen. Es war erforderlich, eine Zellkonzentration zu ermitteln, bei der das Ausmaß von Adhäsion und Proliferation an den unterschiedlich modifizierten Werkstoffoberflächen nach einem bzw. drei Tagen zweifelsfrei differenzier- und messbar ist und bei der das Phänomen der Überkonfluenz vermieden werden kann.

Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, ist eine ausreichend hohe Zellzahl sowohl für die manuelle (Neubauer-Zählkammer) als auch für die apparative Zellzählung (Photoextinktionsmessung, Cellcounter und Analyser System) von Bedeutung. Insbesondere die apparativen Messvorgänge erfordern eine Mindestzellzahl, ab der eine exakte und störungsfreie Messung mit eindeutigen Ergebnissen erst möglich ist.

Die Ergebnisse waren teilweise widersprüchlich und die Ursache hierfür nicht immer ersichtlich. Da mit zunehmender Dauer der Vorversuche einheitlichere Ergebnisse erzielt wurden, muss auch mangelnde Routine und Erfahrung im Umgang mit der Zellkultivierung als Grund hierfür angenommen werden. Mit einer Zellmenge von 1×10^4 /ml für einen und drei Kultivierungstage konnten schließlich stabile und reproduzierbare Ergebnisse für sämtliche Oberflächenmodifikationen erzielt werden. Aufgrund der starken Proliferation der Fibroblasten ist eine Kultivierung mit einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/ml (\varnothing 6,5mm) bei einer Kultivierungsdauer von drei Tagen entsprechend den in der Vorläuferstudie untersuchten Keratinozyten nicht sinnvoll (Klein, et al. 2000).

Überdies dienten die Vorversuche dem Ziel, eine geeignete Methode zur Auszählung bzw. Mengenbestimmung adhärierender Fibroblasten zu finden. Bei der *lichtmikroskopischen Zellzählung* in der Neubauer-Zählkammer konnten anfangs nur äußerst niedrige Zellzahlen ermittelt werden. Zudem waren die Zählergebnisse sehr uneinheitlich und widersprüchlich. Eine Erklärung hierfür lag in einer zu kurzen Trypsinierungsdauer der Abutments und daraus resultierend mangelhafter Zellablösung. Des Weiteren ließen sich zu Beginn keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ermittelten Zellzahlen an den unterschiedlich oberflächenmodifizierten Abutments feststellen. Dies veranlasste, zunächst nach einer alternativen Methode zu suchen, die reproduzierbare Ergebnisse liefert und weitgehend frei von Einflüssen seitens des Untersuchers bzw. fehlerhafter Technik ist.

Um eine Zellzahlbestimmung via Neubauer-Zählkammer zu umgehen, wurde eine Methode zur indirekten Bestimmung der von den Werkstoffen abgelösten Zellmengen gewählt. Zunächst erfolgte nach vorangegangener Lysierung der Fibroblasten die Proteinbestimmung. Die hierbei ermittelten Ergebnisse waren schon deutlich verwertbarer, jedoch war übersehen worden, dass ein Viertel aller Zellträger mit Kollagen beschichtet war.

Da Kollagen ein Eiweiß (aus der Gruppe der fibrillären Proteine) ist, verfälscht es die Ergebnisse zu höheren Werten. Daher wurde nach Ablösen und Lysieren der

Fibroblasten mittels dem Detergenz *Nonidet P40* ein in vitro Assay (Messung der optischen Dichte als Maß für die LDH-Aktivität) zur quantitativen Bestimmung der *Laktatdehydrogenase* nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972 gewählt. Von der optischen Dichte lässt sich auf die LDH-Konzentration umrechnen und hierüber die Zellzahl bestimmen. Die Korrelation Optische Dichte/ Konzentration wird mit Hilfe der *linearen Regression* ermittelt.

Wacker et al. beschrieben 1956 diese hier angewandte Methode zur LDH-Bestimmung mittels Laktat als Substrat und NAD als Koenzym (Wacker 1956). Die Laktatdehydrogenase ist eine NAD^+ Oxidoreduktase und katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Verwendung von NAD^+ als H^+ Akzeptor¹. Diese Reaktion ist bei physiologischem pH-Wert reversibel. Die LDH ist ein zytoplasmatisch gelöstes Enzym und kommt in allen Geweben vor.

Um fehlerhafte Ergebnisse auszuschließen, ist es erforderlich, die Enzymaktivität im linearen Bereich, also bei konstanter Enzymaktivität, zu messen. Die Linearität der Enzymaktivität ist ablesbar an der gleichbleibenden Differenz der über eine Dauer von fünf Minuten fünfmalig gemessenen Optischen Dichte, d.h. die gemessene *Optische Dichte* als Maß für die LDH-Aktivität nimmt pro Minute um einen konstanten Betrag ab. Mit zunehmendem Nachlassen der Enzymaktivität flacht die Aktivitätskurve ab.

Im Falle eines zu großen zeitlichen Abstands der LDH-Bestimmung zur Zugabe des Koenzyms NAD^+ in die Suspension kommt es zu einem vorzeitigen LDH-Verbrauch mit folglich ausbleibenden Messwerten. Daher musste die Zugabe des Koenzyms unmittelbar vor Beginn der Messung erfolgen.

Während der Vorversuche wurden anfangs die Konzentrationen adhärenter Fibroblasten von je vier Abutmenthälften bzw. Plättchen in einem Eppendorf-Röhrchen bestimmt.

Hierbei ergab sich ein lineares Verhältnis von Zellzahl zu LDH-Konzentration. Im Koordinatensystem lies sich daher die entsprechende Anzahl adhärenter Zellen unmittelbar ablesen (Abb. 12).

¹ $\text{L-Laktat} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$

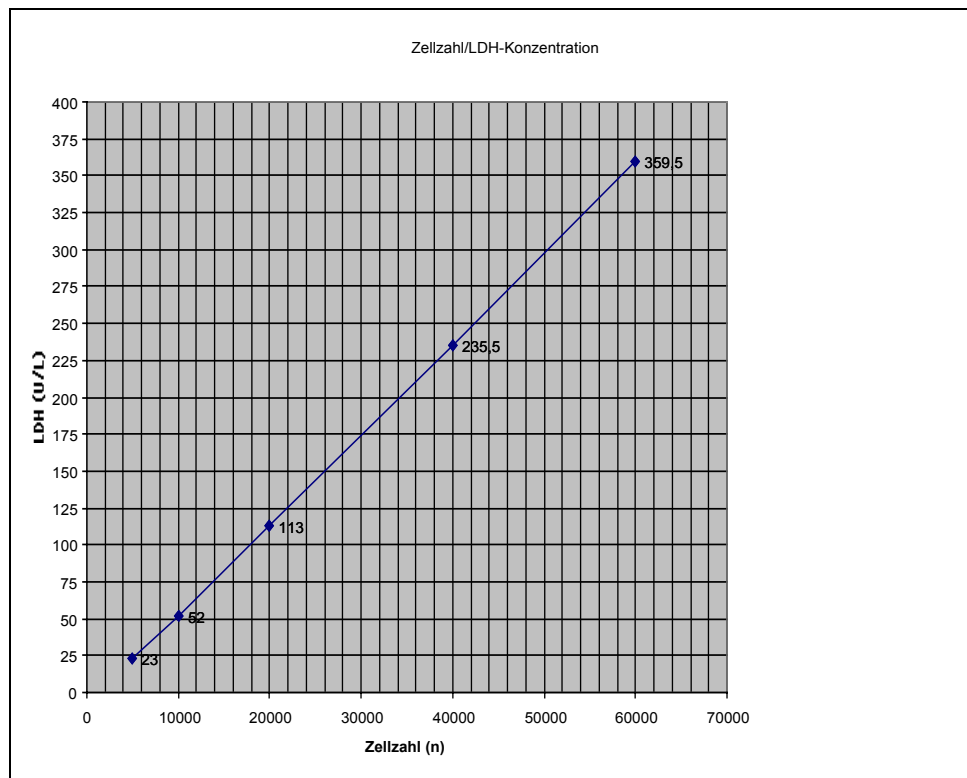


Abb. 12: LDH-Konzentrationen, die in den Standards mit vorgegebenen Zellzahlen ermittelt wurden. Die Grafik lässt einen streng linearen Bezug von Zellzahl und LDH-Konzentration erkennen.

Da die wegen der Vielzahl an Proben extrem aufwendige Messung die Kapazität des Routine-Labors gesprengt hätte, musste auf ein Mikrotiter-System der Firma Dynatech (DYNATECH MR5000, Dynatech Laboratory Products, Microtiter® MIC-2000® MICROELISA®) zurückgegriffen werden. Hierbei wurden die Zellen einer Versuchsreihe von den einzelnen Trägern abgelöst und die gewonnenen Zellsuspensionen in eine frische 96er-Mikrotiterplatte, in der anschließend die Photoextinktionsmessung erfolgte, umgesetzt. Um direkt auf die Zellzahlen rückschließen zu können, wurde die Optische Dichte zusätzlich in 2 mal 7 Standards mit definierten Zellkonzentrationen ($n = 1250, 2500, 5000, 10000, 20000, 40000$ und 60000 Zellen/ ml) gemessen.

Es ergab sich jedoch ein neuerliches Problem: lichtmikroskopisch war regelmäßig Zelldetritus in den Wells nachweisbar. Dieser führte bei der Extinktionsmessung infolge uneinheitlicher Lichtabsorption (Wellenlänge 340 nm) zu fehlerhaften Werten. Ein vollständiges Abzentrifugieren des Zelldetritus in den hier verwandten Mikrotiterplatten war im Gegensatz zu den Eppendorf-Röhrchen wegen Ermangelung einer ausreichend hochtourigen Zentrifuge (für 96er Mikrotiterplatten) nicht möglich. Da sich der Zelldetritus in den Mikrotiterplatten nicht komplett abzentrifugieren ließ und die LDH-

Bestimmung in den Eppendorf-Röhrchen durch das Routinelabor aus den o.a. Gründen nicht möglich war, musste diese effiziente Methode verlassen und zur konventionellen Zellzählung via Neubauer-Zählkammer zurückgekehrt werden.

Zur Kontrolle der vollständigen Ablösung aller an den Werkstoffen haftenden Fibroblasten wurden die Träger nach erfolgter Zellablösung nochmals dem gleichen o.a. Ablösungsverfahren unterzogen und anschließend die LDH-Messung wiederholt. Bei ausbleibender Aktivität der Laktatdehydrogenase galt die komplette Zellablösung als bewiesen. Überdies konnten hierdurch das Ablöseverfahren getestet und die erforderliche Menge an Detergenz, die Ultraschalldauer sowie die benötigte Trypsinmenge und Trypsinierungsdauer ermittelt werden.

Um eine sichere Fixierung der Abutments (Hülsenimplantate) auf der Bodenfläche der Wells zu gewährleisten, wurden diese zunächst in einer eigens hierfür angefertigten Apparatur mittels diamantierter Trennscheibe halbiert. Aufgrund der beim Durchtrennungsvorgang entstehenden Hitzeentwicklung kam es hierbei jedoch zu lokalen Schmelzvorgängen an den Kanten der Implantathälften, weshalb eine vollkommen gleichmäßige Halbierung nicht zu erzielen war.

Zudem können die von der Nährstoffoberfläche herabsinternden Fibroblasten, noch ehe der Adhäsionsprozess stattfindet, von den konvexen Abutmentoberflächen abgleiten (Abb. 13). Dies ist umso wahrscheinlicher, als die Zellaktivität durch die vorangegangene Trypsinierung deutlich herabgesetzt ist (Grinnel 1978). Darüber hinaus unterliegen Zellen zeitabhängigen Reparationsprozessen z.B. nach Trypsinbehandlung, was wiederum die Zellhaftung beeinträchtigt.

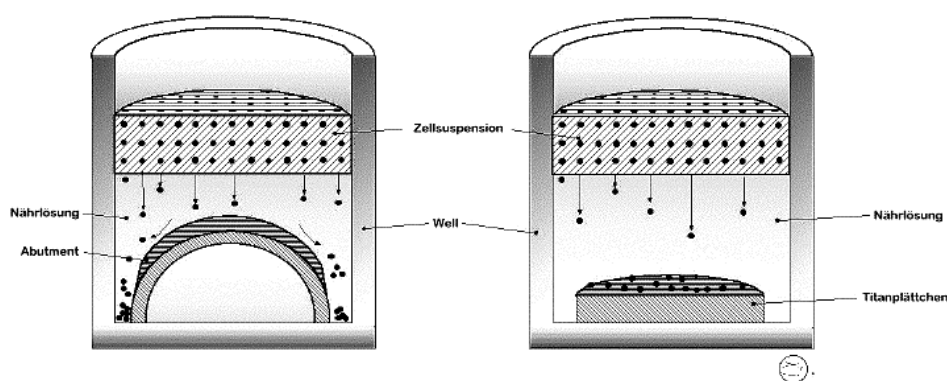


Abb. 13: Zwei Wells mit a) halbiertem, konvexem Abutment, b) flachem Titanplättchen

Von der Flüssigkeitsoberfläche auf den Werkstoff herabsinternde Zellen; im linken Well ist das seitliche Abgleiten der Zellen von der konvexen Werkstoffoberfläche dargestellt.

Der Vorgang der Zelladhäsion verläuft über mehrere Stunden; erst im Anschluss kommt es dann zur Zellvermehrung. Um ein seitliches Abgleiten der Zellen zu verhindern, wurden die konvexen Abutmenthälften durch flache, kreisförmige und 5mm durchmessende Titanplättchen (hergestellt an der Technischen Universität Berlin) ersetzt. Diese Titanplättchen wurden allerdings erst während der letzten Phase der Vorversuche verwendet und schließlich bei den Hauptversuchen durchgängig eingesetzt.

3.2 Versuchsdurchführung

Es werden insgesamt 200 Titanplättchen eingesetzt. Die vorgenommenen Modifikationen der Oberflächen sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Oberflächenmodifikationen

Gruppe	Oberflächenmodifikation	Anzahl Titanplättchen
1	kugelgestrahlt (Korngröße 100 bis 200µm)	20
2	kugelgestrahlt plus RFGDT	20
3	sandgestrahlt	20
4	sandgestrahlt plus RFGDT	20
5	poliert	20
6	poliert plus RFGDT	20
7	silikonbeschichtet	20
8	silikonbeschichtet plus RFGDT	20
9	kollagenbeschichtet	20
10	kollagenbeschichtet plus RFGDT	20

Die sand- und kugelgestrahlten Werkstoffoberflächen werden nach Herstellung, um verfahrensbedingte Rückstände an den Oberflächen nachzuweisen, dem sog. EDAX-Verfahren unterzogen (Abb. 14). Da sich hierbei regelmäßig Silikate nachweisen lassen (auf den sandgestrahlten Plättchen höhere Konzentrationen als auf den glaskugelgestrahlten), müssen diese Rückstände ausgewaschen werden.

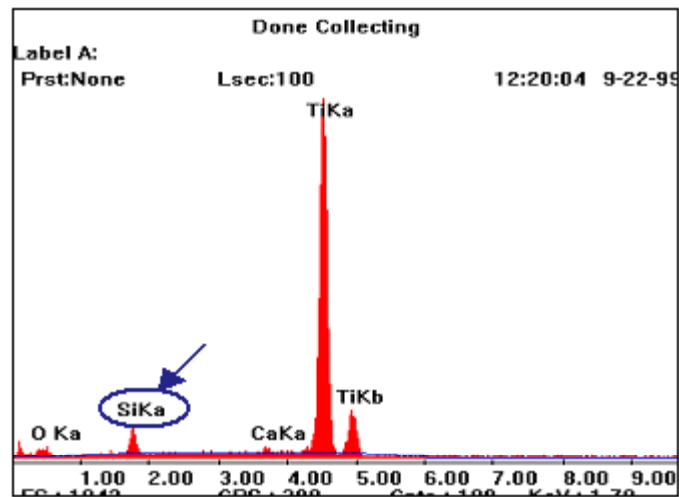


Abb. 14:EDAX (Energy dispersiv analysis of X-ray) sandgestrahlte Oberfläche (Titanplättchen) mit verfahrensbedingten Silikat-Rückständen

Vor Verwendung und Beschichtung werden die Werkstoffe zunächst mit einer feinen, weichen Dentalbürste und in einem 15 minütigem Ultraschallbad (Cheung und Luk 2000) gereinigt. Im Anschluss folgt die Sterilisierung.

Die Silikonbeschichtung (lufttrocknendes Silikon, Rehau 1511/THF (Tetrahydrophan) 1:4) erfolgt nach vorherigem Auftragen eines Primers (Wacker Grundierung G790). Die Beschichtung mit Kollagen A geschieht, indem die Plättchen über 2 Stunden bei 37°C in 100µl einer Lösung mit 50µg Kollagen A inkubiert werden. Diese Vorgehensweise orientiert sich an früheren Untersuchungen von O'Keefe und Woodley (O'Keefe, et al. 1985;Woodley, et al. 1988). Die mit Silikon zu beschichtenden Titanplättchen werden erst nach Beschichtung sterilisiert.

Die polierten, nicht oberflächenmodifizierten Plättchen, deren Oberflächen denen der konventionellen polierten Abutments entsprechen, dienen als Kontrollgruppen. Um herauszufinden, für welche Oberflächenart das RFGD-Verfahren von Vorteil ist, wird die Hälfte aller oberflächenmodifizierten Titanplättchen zusätzlich dem Radio-frequency-glow-discharge- Treatment (RFGDT) unterzogen (Abb. 15). Hierdurch entsteht für jede Oberflächenart eine weitere Modifikation.



Abb. 15: RFGDT-Gerät

Pro Versuchsdurchgang werden 20 Plättchen je Oberflächenart untersucht. Jeder Versuchsdurchgang erfolgt unter sterilen Kautelen. Die vorbereiteten Titanplättchen werden, ohne hierbei die Implantatoberflächen zu berühren, mit Hilfe einer sterilisierten Spezialpinzette in die Wells der 96er Mikrotiterplatten eingebracht. Im Anschluss werden die belegten Wells mit 150 µl Nährlösung (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) aufgefüllt und abschließend mit der in der Neubauer-Zählkammer ermittelten Zellmenge beschickt. Auf diese Weise können die Zellen von der Mediumoberfläche gleichmäßig verteilt auf die Implantatoberflächen herabsintern.

Die Ermittlung der Zellzahl entsprechend einer Konzentration von 1×10^4 Zellen und die Berechnung der hierzu erforderlichen Menge an Zellmedium erfolgt nach Passagieren der Fibroblastenkulturen (primäre Zellkultur von humanen Hautfibroblasten).

Die Mikrotiterplatten werden nun entsprechend der Inkubationsplanung für die Dauer von 12 und 72 Stunden bei 37°C und 5,0% CO₂-Atmosphäre bebrütet (Inkubations-schrank Fa. Heraeus, Hanau, BRD). Während der Versuchsphase werden die Zellrasen in den Wells seitlich der Plättchen auf den werkstofffreien Bodenflächen und in den leeren Kontrollwells einmal täglich lichtmikroskopisch auf Vitalität und Dichte überprüft.

Nach 12 bzw. 72 Stunden werden die Titanplättchen aus den Wells entnommen und in freie Wells der 96er Mikrotiterplatte umgesetzt (Abb. 16). Dort erfolgt nun die Trypsinierung, indem die Wells mit je 50 µl Trypsin ((1:250) 2,5% (w/v)) aufgefüllt werden. Die Neutralisierung des Trypsins geschieht durch weiteres Auffüllen der Wells mit 100 µl Nährstofflösung.

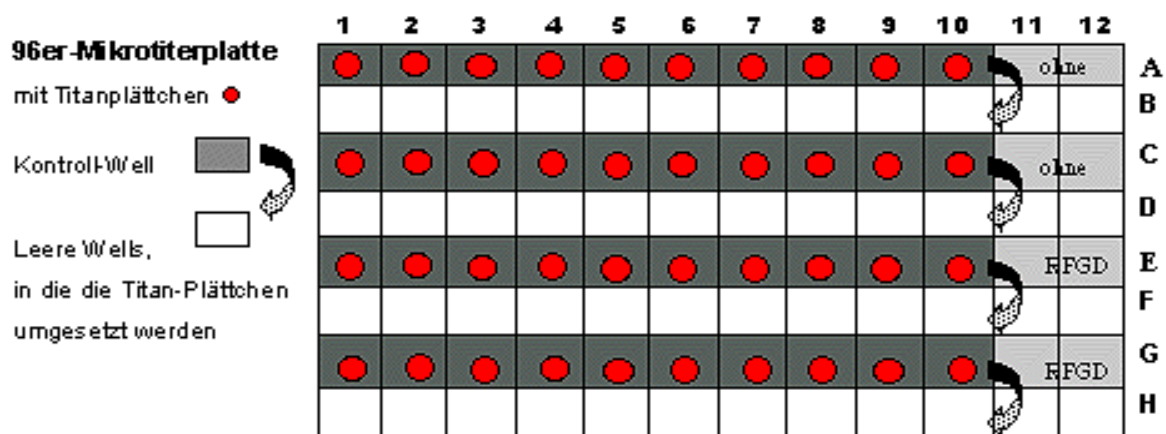


Abb. 16: Dargestellt ist das Umsetzen der Titanplättchen in leere Wells derselben Mikrotiterplatte nach abgeschlossener Kultivierung (12 u. 72 h); in den leeren Wells erfolgt die Ablösung der Zellen von den Werkstoffoberflächen zwecks anschließender Zellzählung

50µl der gut durchmischten Zellsuspension werden nun entnommen und durch Zugabe von weiteren 50µl Trypanblau-Lösung angefärbt. Nach Verwerfen eines Tropfens wird die Zählkammer durch Heranbringen eines Tropfens an den oberen Rand des Deckglases gefüllt, sodass die Zellsuspension die eingeritzten Zählnetze bedeckt. Die Zahl anhaftender Fibroblasten/ ml wird wie folgt errechnet:

Jedes der vier auszuzählenden Quadrate hat eine Fläche von 1mm^2 und eine Tiefe von 0,1mm entsprechend einem Volumen von 0,1µl. Um die *Zellkonzentration* pro Milliliter zu erhalten, wird der Mittelwert aus den 4 Quadraten mit 10^4 multipliziert. Jede der Zählungen erfolgt wenigstens zweimal. Avitale Zellen werden mitgezählt.

Die *Zelldichte* pro Flächeneinheit errechnet sich, indem die Zellzahl des über der Fläche abgemessenen Volumens durch die Größe der Fläche geteilt wird:

Innendurchmesser eines Wells	0,65 cm
Fläche ($\pi \times r^2$):	$3,1415 \times 0,1056 \text{ cm}^2 = 0,3318 \text{ cm}^2$
Zellzahl/ ml:	$1 \times 10^4 \text{ Zellen/ cm}^3$
Volumen der Zellsuspension:	$0,15 \text{ cm}^3$
Zelldichte/cm ² :	$0,15 \times 10^4 / 0,3318 = 4521 \text{ Zellen/cm}^2$

Einmalig zu Beginn der Versuchsreihen werden die Titanplättchen nach einem Kultivierungsdurchgang von einem bzw. drei Tagen einer Kontrolle auf komplette Zellablösung (siehe Kap. 3.1, S. 30) unterzogen, um so die komplette Zellablösung zu gewährleisten.

Zwecks elektronenmikroskopischer Untersuchung werden parallel zu jedem Versuchsdurchgang je zwei Titanplättchen pro Oberflächenart in gleicher Weise mit Fibroblasten beschickt und bebrütet. Nach 12 bzw. 72 Stunden werden die auf den Titanplättchen gezüchteten Zellkulturen dreimal mit PBS gewaschen und für mindestens 6 Stunden mit Glutaraldehyd 2% in Sörensens Phosphatpuffer (0,06 M, pH 7,2) fixiert. Anschließend erfolgt die Entwässerung der Proben in aufsteigender Alkoholreihe (stufenweise Steigerung der Alkoholkonzentration um 10%). Danach werden die Proben für 2 mal 10 Min. mit Hexamethyldisilazan (HMDS Sigma®) infiltriert, 24 Stunden luftgetrocknet und abschließend mit Gold (BAL-TEC MED 020) beschichtet (Brat, et al. 1997; Bray, et al. 1993). Die elektronenmikroskopische Untersuchung wird mit einem Rasterelektronenmikroskop DSM 982 Gemini der Fa. Zeiss durchgeführt.

3.3 Verwendete Zellart und Zellkultivierung

Die hier verwendeten Fibroblasten der Fa. Cell-Lining, Berlin, (HIFB Cryopreserved or Proliferating) entstammen einer in antibiotikafreiem Zellmedium gezüchteten Zelllinie menschlicher Hautzellen (23jährige Kaukasierin, Blutgruppe 0 positiv). Es handelt sich um eine *Primärzellkultur (Primaria)*. Proben der Zelllinie werden entsprechend der Richtlinien der Europäischen und Amerikanischen Gesellschaft für Pharmakologie in bakterienhaltiges Medium überimpft und bei 30-35° parallel inkubiert. Um temperaturempfindliche Keime besser erkennen zu können, werden Proben jeder Passage bei drei unterschiedlichen Temperaturbereichen (20-25, 30-35 und 35-39°) bebrütet. Während der Zellzüchtung erfolgt fortlaufend eine lichtmikroskopische Kontrolle der Kulturen. Vor Auslieferung werden die Chargen als kontaminationsfrei verifiziert und für weitere zwei Wochen nach Auslieferung auf mögliche Keimbesiedlung untersucht.

Unmittelbar nach Erhalt einer Zell-Charge erfolgt die sofortige Passage der Zellen. Die Zellen werden hierbei auf vier Kulturflaschen und zusätzlich auf eine Einfrierkapsel verteilt. Nur während der ersten fünf Zellpassagen wird ein Teil der Fibroblasten mittels Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff für eventuelle spätere Tests konserviert. Auf diese Weise ist die Durchführung aller Testreihen mit derselben Charge einer Zelllinie gewährleistet.

Zwecks Passage werden die Fibroblasten nach zweimaliger Spülung mit PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) mittels Trypsin (Trypsin (1:250) 2,5% (w/v) in PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) abgelöst. Der Trypsinierungsprozess wird unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Die Zellen nehmen hierbei eine typisch kugelförmige Gestalt an, schwimmen auf der Oberfläche und lassen sich bereits durch Abklopfen („Shake-off“-Verfahren) vom Substrat lösen. Nach Resuspension von 20ml Nährlösung werden die abgelösten Zellen direkt in vier Kulturflaschen überführt. Um eine schonende Zellpassage durchzuführen, wird nach Ablösen der Zellen auf ein Zentrifugieren verzichtet. Zur Kontrolle auf vollständige Ablösung der Fibroblasten erfolgt eine abschließende lichtmikroskopische Kontrolle der Kulturflaschenböden.

Der Nährmediumwechsel in den Kulturflaschen geschieht dreitägig, mit Ausnahme des ersten Mediumwechsels am ersten Tag nach Passage. Dahingegen erfolgt bei den Versuchsreihen am zweiten Kultivierungstag ein einmaliger Nährmediumwechsel in den Mikrotiterplatten.

Auf dem Boden der 75 cm²-Kulturflasche lässt sich lichtmikroskopisch schon nach drei Tagen eine deutliche Konfluenz der Zellkolonien bei noch stellenweise lückenhaftem Zellrasen und nach weiteren zwei Tagen ein dichter, monolayerartiger Zellrasen erkennen. Nach insgesamt acht Tagen ist der Boden von einem z.T. mehrschichtigen, dichten und gesunden Zellrasen bedeckt. Zu diesem Zeitpunkt wird die erneute Zellpassage durchgeführt und ein neuer Versuchsdurchgang begonnen.

Die in den Vor- und Hauptversuchen verwendeten Materialien sind der Tabelle 11 im **Anhang 8.1**, S.95 zu entnehmen.

3.4 Statistische Verfahren

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS, die Aufarbeitung der statistischen Graphik zusätzlich mit Microsoft® Excel 98.

Zur Beurteilung des RFGD-Verfahrens wird der **U-Test von Mann und Whitney** verwendet.

Zur statistischen Beantwortung der Frage nach der besten Oberflächenmodifikation bezüglich des Gesamteffektes von Adhäsion und Proliferation sowie zur Beurteilung der höchsten Adhäsivität einer Oberfläche wird das **Teilmengen-Auswahlverfahren von Hsu** eingesetzt.

Die abschließende Signifikanztestung erfolgt für die 12-h-Werte mit dem **Kruskal-Wallis-Test** und für die 72-h-Werte mit dem **U-Test von Mann und Whitney**.

Die elektronenmikroskopischen Befunde in Abhängigkeit der Kulturdauer werden anhand eines Scores ausgewertet und deskriptiv-statistisch analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Schon während der Vorversuche war eine Beeinflussung des von diversen Oberflächen abhängigen Wachstumsverhaltens der Fibroblasten erkennbar. Allerdings wurden in dieser Versuchsphase einzig polierte, sandgestrahlte, kollagen- und silikonbeschichtete, nicht aber kugelgestrahlte Titan-Abutments und keine Titanplättchen verwendet. Die mit Hilfe des in-vitro Assays zur Bestimmung der LDH-Aktivität ermittelten Resultate entsprachen tendenziell den späteren Ergebnissen und der parallel zu den Hauptversuchen durchgeführten elektronenmikroskopischen Auswertung, die anhand eines Bewertungsscores (s.a. Tab. 9, S. 53) vorgenommen wurde.

Interessant war, dass die silikonbeschichteten Titan-Abutments die niedrigste LDH-Konzentration und damit den geringsten Zellbewuchs aufwiesen. Überdies führte die RFGD-Behandlung der silikonbeschichteten Oberflächen zu keiner nennenswerten Steigerung des Zellbewuchses nach 72 Stunden.

Während nach einer 12-stündigen Kultivierungsdauer an den *polierten, nicht RFGD-vorbehandelten* Titan-Abutments die höchsten LDH-Konzentrationen (72 U/L) nachweisbar waren, wurden nach 72 Stunden die höchsten LDH-Konzentrationen (259 U/L) an den *kollagenbeschichteten und RFGD-vorbehandelten* Titan-Abutments bestimmt. Des Weiteren übertraf nach 72 Stunden das Zellwachstum an den polierten plus RFGD-vorbehandelten Titan-Abutments das Wachstum der auf den polierten, *nicht* RFGD-vorbehandelten Abutments kultivierten Fibroblasten. In der Gruppe der polierten, mit und ohne RFGD vorbehandelten Abutments ergaben sich nach 72 Stunden umgekehrte Wachstumsverhältnisse gegenüber einer 12-stündigen Kultivierungsdauer, bei der gegenüber den RFGD-vorbehandelten plus polierten Oberflächen höhere Zellzahlen an den RFGD-unbehandelten und polierten nachgewiesen werden konnten.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass nicht allein die Oberflächenbeschichtung, sondern auch die Kultivierungsdauer der Fibroblasten auf das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der Fibroblasten einwirkt. Offensichtlich kommt es hinsichtlich der Fibroblastenadhärenz und –proliferation an unterschiedlichen Oberflächentexturen zu quantitativen Verschiebungen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die anfängliche Adhäsionsaktivität der Fibroblasten an einer Oberflächenart wird

offensichtlich nach einiger Zeit von der Proliferationsrate dieser Zellen auf einer anderen Oberflächentextur mit schlechterer Adhäsivität überholt (Tab. 3).

Mittels unterschiedlich langer Kultivierungsphasen können demnach einerseits die Fibroblastenadhäsion, und andererseits die Fibroblastenproliferation quantitativ erfasst werden.

Tab. 3: Übersicht über die mittels Aktivitätsbestimmung der LDH ermittelten Zellzahlen

	12 Stunden		72 Stunden	
	U / L	Zellzahlen	U / L	Zellzahlen
sandgestrahlt ohne RFGD	52	10400	194	32000
sandgestrahlt mit RFGD	64	12850	246	40000
polierte Abutments ohne RFGD	72	14500	121	20000
polierte Abutments mit RFGD	50	10000	204	34000
silikonbeschichtet ohne RFGD	28	5100	35	6500
silikonbeschichtet mit RFGD	23	4000	20	3700
kollagenbeschichtet ohne RFGD	55	11100	122	20500
kollagenbeschichtet mit RFGD	73	14700	259	42500

Der in-vitro Assay zur Bestimmung der LDH-Aktivität ergab eine nahezu lineare Beziehung der LDH-Konzentration zur Zellzahl (Abb. 17). Die pro Oberflächenart ermittelten Zellzahlen lagen allerdings insgesamt unter denen der im Hauptversuch ausgezählten.

Die Zellzahlen wurden abgelesen aus einem Liniendiagramm (s.a. Kap. 3.1, S.29), welches anhand der in den Standards mit vorgegebenen Zellmengen ($n = 1250, 2500, 5000, 10000, 20000, 40000$ und 60000 Zellen/ ml) berechneten LDH-Konzentrationen erstellt wurde.

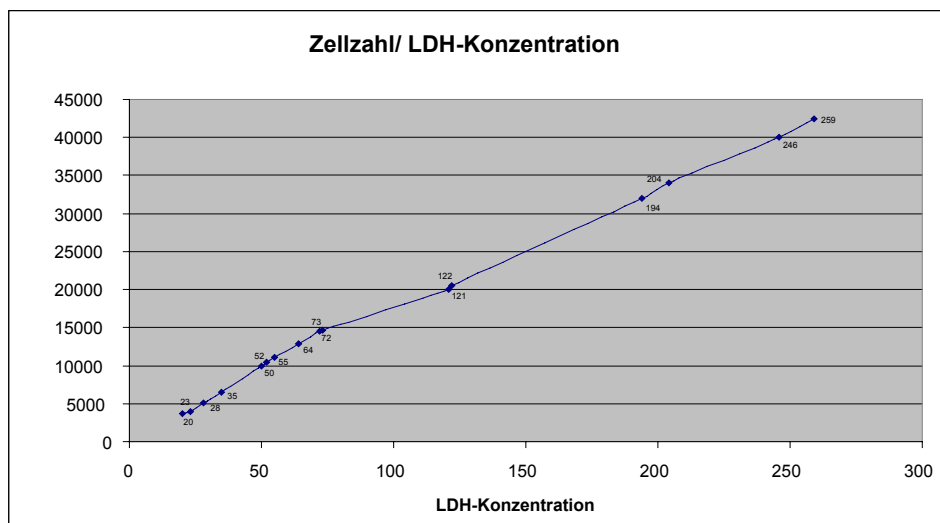


Abb. 17: LDH-Konzentrationen anhand derer die Zellzahlen ermittelt wurden;

zu erkennen ist die nahezu lineare Beziehung zwischen LDH-Konzentration und Zellzahl

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

4.3 Ergebnisse der Zellzählung via Neubauer-Zählkammer

4.3.1 RFGD-Verfahren versus ohne RFGD-Verfahren

Die **Auswertung** der ermittelten Zellzahlen erbrachte **nach 12 Stunden** folgende Ergebnisse (Tab. 4):

- **Adhäsion:** das RFGD-Verfahren ist überlegen bei kugelgestrahlter, sandgestrahlter oder kollagenbeschichteter Oberfläche, unterlegen bei Silikonbeschichtung. Bei Polierung lässt sich keine klare Aussage treffen.

Tab. 4: Ergebnisse für die 12-h-Werte - "mit" RFGD-Verfahren versus "ohne" RFGD-Verfahren

Gruppe	Oberflächenart	Median Zellzahl	p-Wert
1	kugelgestrahlt ohne RFGD	15000	<0.0005
2	kugelgestrahlt mit RFGD	22500	
3	sandgestrahlt ohne RFGD	17500	<0.0005
4	sandgestrahlt mit RFGD	22500	
5	poliert ohne RFGD	25000	0.05
6	poliert mit RFGD	22500	
7	silikonbeschichtet ohne RFGD	10000	0.038
8	silikonbeschichtet mit RFGD	7500	
9	kollagenbeschichtet ohne RFGD	17500	<0.0005
10	kollagenbeschichtet mit RFGD	22500	

Die **Auswertung** der ermittelten Zellzahlen erbrachte **nach 72 Stunden** folgende Ergebnisse (Tab. 5):

- **Proliferation:** Werden allein die am Ende der 72stündigen Kultivierung gemessenen Zellzahlen miteinander verglichen, ist wie bei der Adhäsion das RFGD-Verfahren bei den gleichen Oberflächen überlegen, außerdem noch bei polierter Oberfläche. Es ist unterlegen bei Silikonbeschichtung.

Tab. 5: Ergebnisse für die 72-h-Werte - "mit" RFGD-Verfahren versus "ohne" RFGD-Verfahren

Gruppe	Oberflächenart	Median Zellzahl	p-Wert
1	kugelgestrahlt ohne RFGD	28750	0.014
2	kugelgestrahlt mit RFGD	35000	
3	sandgestrahlt ohne RFGD	30000	0.001
4	sandgestrahlt mit RFGD	37500	
5	poliert ohne RFGD	35000	<0.0005
6	poliert mit RFGD	62500	
7	silikonbeschichtet ohne RFGD	12500	<0.0005
8	silikonbeschichtet mit RFGD	7500	
9	kollagenbeschichtet ohne RFGD	27500	<0.0005
10	kollagenbeschichtet mit RFGD	58750	

Die Tabellen „RFGD-Verfahren versus ohne RFGD-Verfahren“ enthalten die p-Werte der *U-Tests von Mann und Whitney*. Die p-Werte zeigen, dass die Verteilung der Zellzahlen nicht symmetrisch ist.

Die asymmetrische Verteilung der 12- und 72-h-Werte ist in der Boxplotdarstellung (Abb. 18, 19) gut erkennbar:

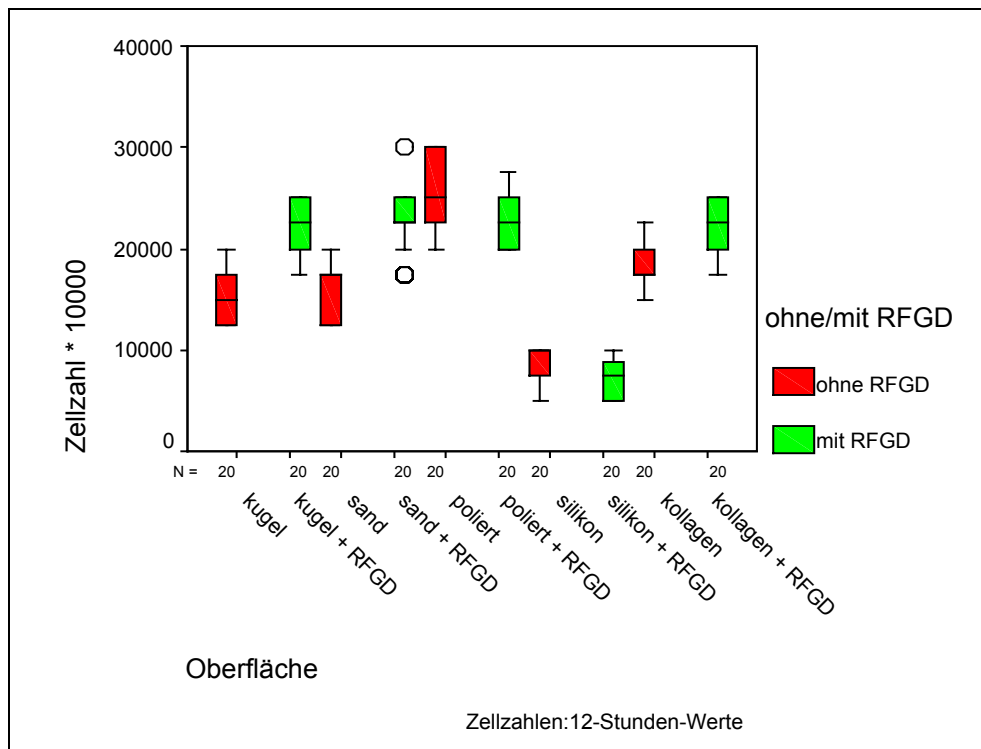


Abb. 18: ermittelte Zellzahlen für die 12h-Werte

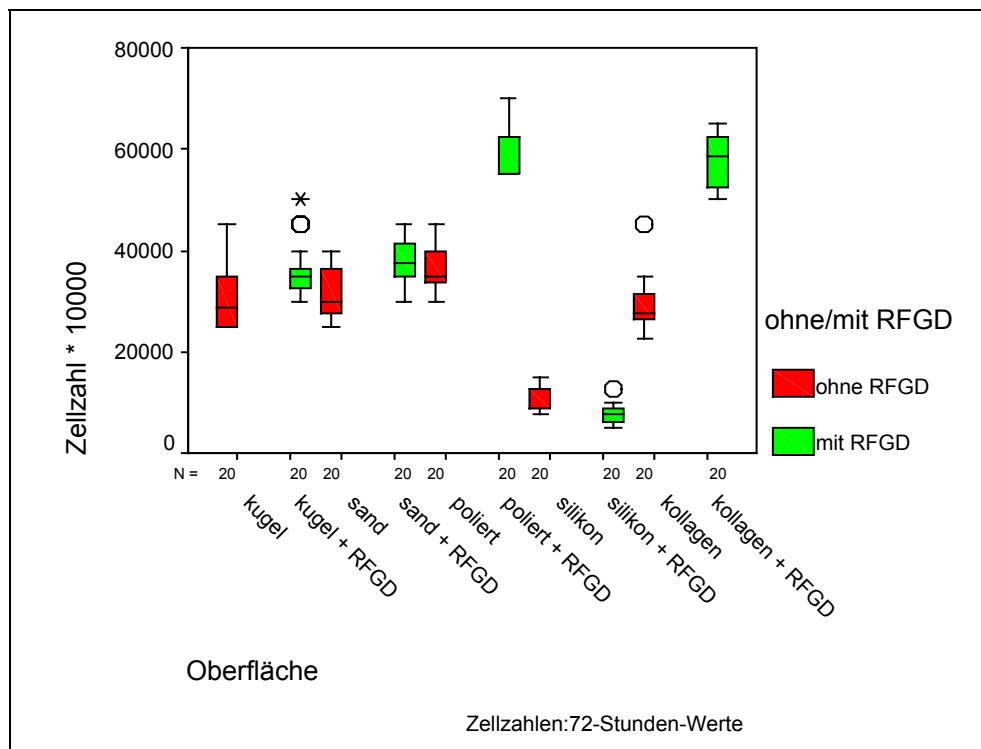


Abb. 19: ermittelte Zellzahlen für die 72h-Werte

4.3.2 Ergebnisse für die 12-Stunden-Werte

Zur statistischen Beantwortung der Frage nach der besten Oberflächenart wird das verteilungsfreie **Auswahlverfahren von Hsu** angewendet, wobei eine Untermenge aus einer Oberflächenart selektiert wird (Tab. 6²).

Tab. 6: Ergebnisse des Teilmengen-Auswahlverfahrens für die 12-Stunden-Werte

Auswahl	Gruppe	Oberflächenart	P-Werte
Auswahl einer Teilmenge aus den 5 Oberflächenarten ohne RFGD	Gruppe 5	poliert	(Teilmengen-Auswahlverfahren von Hsu)
Auswahl einer Teilmenge aus den 5 Oberflächenarten mit RFGD	Gruppe 2 Gruppe 4 Gruppe 6 Gruppe 10	kugel+ RFGD sand + RFGD poliert + RFGD Kollagen A + RFGD	(Kruskal-Wallis-Test) 0.870
Auswahl einer Teilmenge aus allen 10 Oberflächenarten	Gruppe 2 Gruppe 4 Gruppe 5 Gruppe 6 Gruppe 10	kugel + RFGD sand + RFGD poliert poliert + RFGD Kollagen A + RFGD	(Kruskal-Wallis-Test) 0.162

Betrachtet man alle 10 Oberflächenarten zusammen, so ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% eine der fünf ausgewählten die am besten geeignete Oberfläche. Da diese fünf Oberflächenarten in den 12h-Werten im statistischen Test (Kruskal-Wallis-Test) nicht signifikant voneinander verschieden sind ($p\text{-Wert} > 0.05$), lässt sich die Aussage des Auswahlverfahrens in diesem Fall nicht noch weiter eingrenzen.

Dasselbe gilt analog auch für die vier ausgewählten aus den Oberflächenarten mit RFGDT und für die einzige, aus den fünf Oberflächenarten ohne RFGDT ausgewählte.

² Die vorliegenden Berechnungen sind alle zur statistischen Sicherheit ($1 - \alpha = 1 - 0.05 = 0.95$) durchgeführt.

4.3.3 Ergebnisse für die 72-Stunden-Werte

Die 72-h-Stundenwerte allein auszuwerten bedeutet, gewissermaßen den Gesamteffekt von Adhäsion und Proliferation nach 72 Stunden zu beurteilen (Tab. 7). Auch hierbei wird zur statistischen Beantwortung der Frage nach der besten Oberflächenart das verteilungsfreie **Auswahlverfahren von Hsu** angewendet.

Tab. 7: Ergebnisse des Teilmengen-Auswahlverfahrens für die 72-Stunden-Werte

Auswahl	Gruppe	Oberflächenart	P-Werte
Auswahl einer Teilmenge aus den 5 Oberflächenarten ohne RFGD	Gruppe 5	poliert	(Teilmengen-Auswahlverfahren von Hsu)
Auswahl einer Teilmenge aus den 5 Oberflächenarten mit RFGD	Gruppe 6 Gruppe 10	poliert + RFGD Kollagen A+ RFGD	(Mann-Whitney-U-Test) 0.127
Auswahl einer Teilmenge aus allen 10 Oberflächenarten	Gruppe 6 Gruppe 10	poliert + RFGD Kollagen A+ RFGD	(Mann-Whitney-U-Test) 0.127

Für die 10 Oberflächenarten zusammen betrachtet ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% die am besten geeignete Oberfläche eine der beiden ausgewählten (*poliert plus RFGDT*, *Kollagen A plus RFGDT*). Da die beiden Oberflächenarten bezüglich der 72h-Werte im statistischen Test nicht signifikant voneinander verschieden sind, lässt sich die Aussage des Auswahlverfahrens in diesem Fall nicht noch weiter eingrenzen.

Interessant ist, dass sich in der Gruppe der nicht RFGD-vorbehandelten Oberflächen im Gegensatz zur Gruppe der RFGD-behandelten nach 12 und 72 Stunden Zellkultivierung nur eine einzige, nämlich die polierte Titanoberfläche, als die Beste herausstellt. Des Weiteren ist unter allen Teilmengen die Gruppe der polierten Oberflächen entweder die beste oder bei den am besten geeigneten Oberflächen.

Eine zusammenfassende, klassenbezogene Darstellung der an den diversen Werkstoffoberflächen ermittelten Zellzahlen geben nachfolgende Histogramme (Abb. 20, 21).

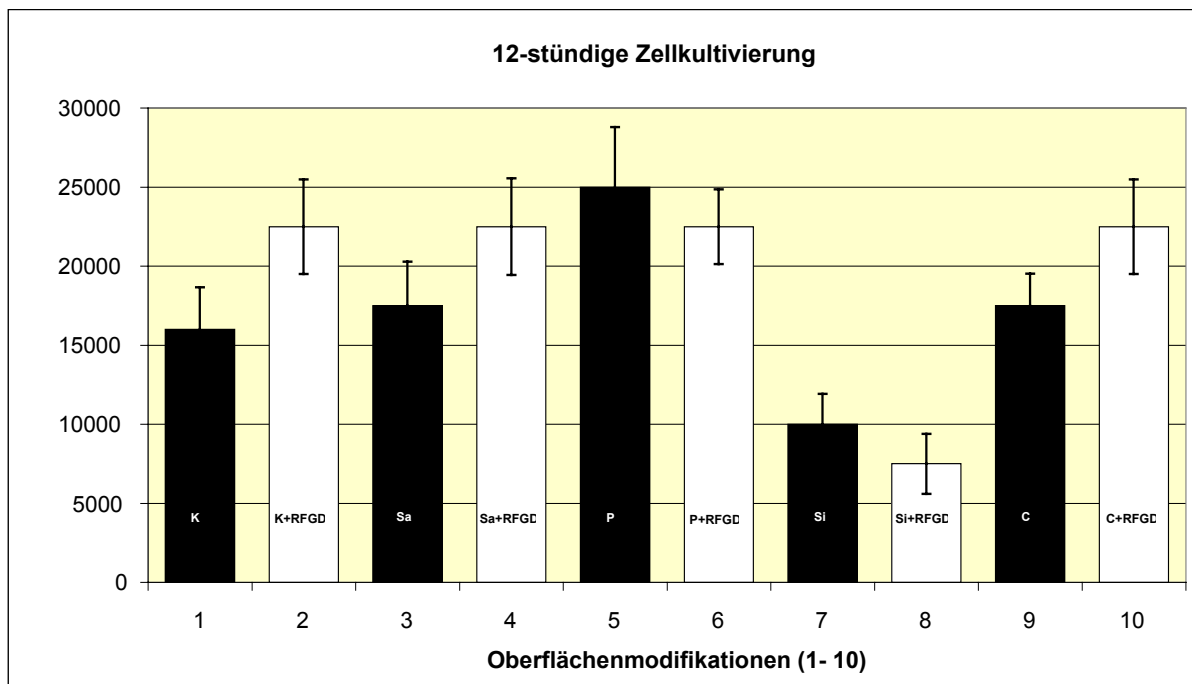


Abb. 20: Zellzahlen am Ende der 12-stündigen Kultivierung (Medianwerte plus Standardabweichung)

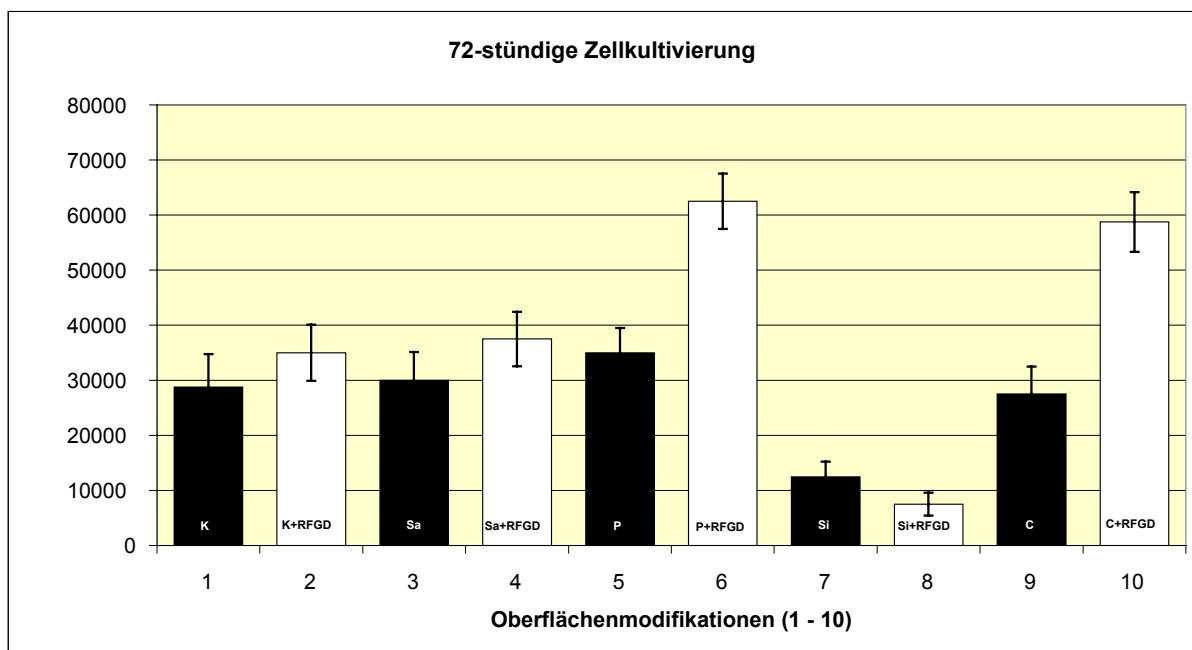


Abb. 21: Zellzahlen am Ende der 72-stündigen Kultivierung (Medianwerte plus Standardabweichung)

1= kugelgestrahlt

2= 1+ RFGD

3= sandgestrahlt

4= 3+ RFGD

5= poliert

6= 5+ RFGD

7= Silikon-beschichtet

8= 7+ RFGD

9= Kollagen-beschichtet

10= 9+ RFGD

4.3.4 Vergleichende Betrachtungen – deskriptive Auswertungen

Während die RFGD-Behandlung der *silikonbeschichteten* Titanplättchen zu einer verringerten Zellanhaftung (12h) und –proliferation (72h) und an den *polierten RFGD-behandelten* Titanplättchen zu keiner verbesserten Zellhaftung (12h) führt, scheint dieses Verfahren dahingegen bei allen anderen Werkstoffoberflächen signifikant von Vorteil.

Die genauere Betrachtung der *zeitabhängigen Wachstumsvorgänge* an den einzelnen Werkstoffoberflächen zeigt auf, dass es offensichtlich bei den *kugelgestrahlten* und RFGD-vorbehandelten Titanplättchen zu einer deutlicheren Steigerung der Adhäsion als der Proliferation kommt. Bei den *sandgestrahlten* und RFGD-vorbehandelten Titanplättchen besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich Adhäsion (12h-Wert) und Proliferation (72h-Wert). Insbesondere wird die Fibroblastenproliferation an den *polierten* (79%-ige Zunahme) und an den *kollagenbeschichteten* Plättchen (114%-ige Zunahme) durch die RFGD-Behandlung erheblich gesteigert (Tab. 8).

Tab. 8: Prozentuale *Differenzen* der gemessenen Zellzahlen innerhalb einer Oberflächenklasse “ohne” versus “mit” RFGD-Behandlung ohne Berücksichtigung der Zuwachsraten:

Oberflächen	Ku/ Ku+RFGD	Sa/ Sa+RFGD	P/ P+RFGD	Si/ Si+RFGD	C/ C+RFGD
Gruppe	1/ 2	3/ 4	5/ 6	7/ 8	9/ 10
Differenz 12h	50%	29%	-10%	-25%	29%
Differenz 72h	22%	25%	79%	-40%	114%

Die statische Betrachtungsweise der ermittelten Zellzahlen allein am Ende einer 12– und 72–stündigen Zellkultivierung reicht nicht aus, da hierbei die divergierenden *Zuwachs- bzw. Proliferationsraten* der Fibroblasten auf den unterschiedlich oberflächenmodifizierten Trägern unberücksichtigt bleiben. Um die *tatsächlichen* Proliferationsraten der Fibroblasten beurteilen zu können, ist eine dynamische, also auf einen Zeitraum bezogene Betrachtungsweise der Wachstumsvorgänge auf den verschiedenartigen Titanträgern erforderlich, welche die unterschiedlichen Wachstumsraten *nach erfolgter Adhäsion* der Zellen berücksichtigt. Jedoch können die prozentualen Zuwächse im vorliegenden Studiendesign mit statistischen Tests nicht

beurteilt werden. Die deskriptive Analyse vermag jedoch eine Tendenz im Proliferationsverhalten der Fibroblasten im Zeitraum von 12 bis 72 Stunden aufzuzeigen.

Die größte Zunahme des Zellbewuchses nach 72 Stunden zeigen demnach weiterhin 1.) die *polierten plus RFGD-behandelten* ($\geq 1,5$ fache Zunahme) sowie 2.) die *Kollagen plus RFGD-behandelten* Titanplättchen ($> 1,5$ fache Zunahme). Zwischen beiden Oberflächenarten besteht eine Differenz von 17% zugunsten der polierten Plättchen.

Hinsichtlich der Zuwachsraten im Zeitraum 12h bis 72h schneiden die *silikonbeschichteten* Oberflächen am schlechtesten ab. Das RFGD-Treatment führt hier zu keiner Verbesserung des Zellwachstums auf den Silikonoberflächen. Zudem zeigen die silikonbeschichteten Oberflächen von allen Oberflächenmodifikationen den schlechtesten Zellbewuchs jeweils nach 12 **und** 72 Stunden. Den prozentualen Zuwachs des Zellbewuchses in diesem Zeitraum abhängig von der Oberflächenmodifikation veranschaulicht nachfolgende Abbildung (Abb. 22).

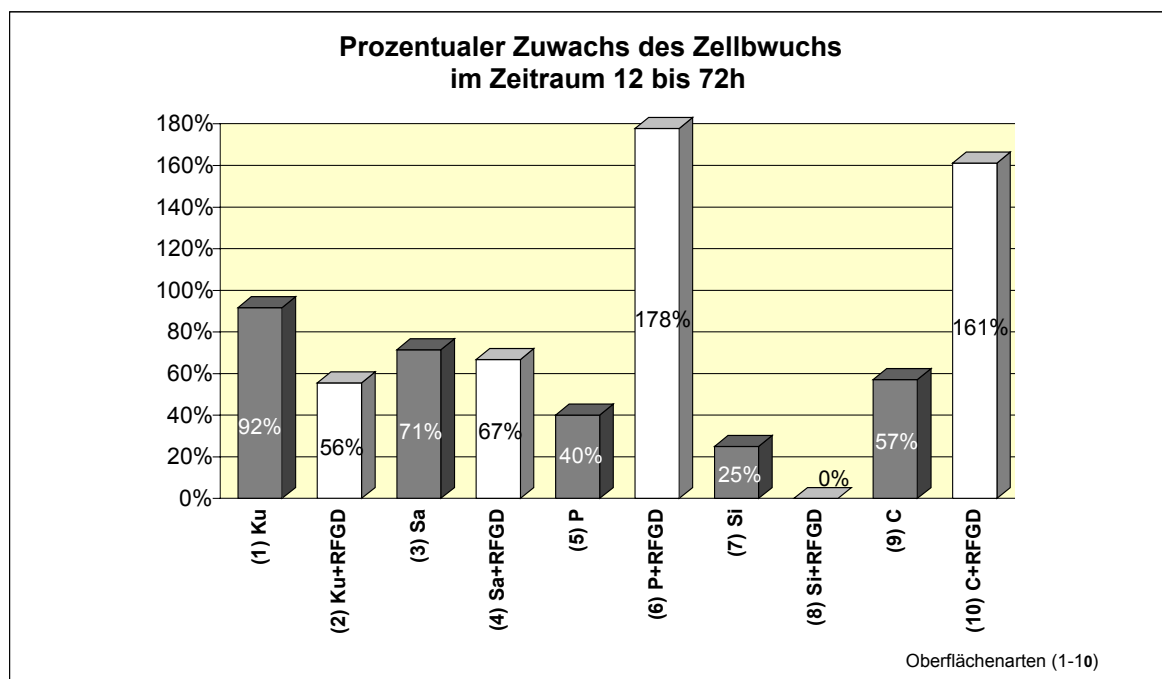


Abb. 22: prozentuale Zellzuwächse im Zeitraum zwischen 12 und 72 Stunden
(zugrunde gelegt wurden die Medianwerte)

Wenngleich die *kugelgestrahlten und RFGD-behandelten* Plättchen gegenüber den unbehandelten eine deutlich geringere Zunahme des Zellbewuchses nach 72 Stunden Kultivierung zeigen, so weisen sie am Ende dennoch einen stärkeren Bewuchs auf als

die physikalisch unbehandelten, kugelgestrahlten Titanplättchen. Bei den *sandgestrahlten* Titanträgern besteht zwischen den RFGD-behandelten und unbehandelten kein signifikanter Unterschied.

Es lässt sich festhalten: Der anfängliche Eindruck eines Vorteils der RFGD-Behandlung für die Zellproliferation an kugelgestrahlten Trägern scheint trügerisch. Tatsächlich ist bei diesen Oberflächen die Proliferationsrate nach RFGD-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten niedriger. Die nach 72 Stunden höheren Zellzahlen bei den RFGD-behandelten und kugelgestrahlten Titanträgern kommen schlicht dadurch zustande, dass nach erfolgter Zelladhäsion die *Ausgangswerte* (Zahl adhärenter Zellen) über denen der physikalisch unbehandelten liegen. Trotz geringerer Proliferationsraten liegen daher am Ende einer 72-stündigen Kultivierung die an den RFGD-behandelten Oberflächen gemessenen Zellzahlen über denen der unbehandelten. Möglicherweise wäre bei einer längeren Kultivierungsdauer gegenüber den nicht-RFGD-behandelten Plättchen ein geringerer Bewuchs auf den RFGD-behandelten kugel- und sandgestrahlten Plättchen nachweisbar.

4.4 Elektronenmikroskopische Befunde

4.4.1 Fibroblastenwachstum und Kolonienbildung

Die Ausbildung des Zellrasens einer Fibroblastenkultur erinnert in ihrem Muster an die Papillarleisten einer Fingerbeere. Offensichtlich bewegen sich einzelne, anfangs weit voneinander getrennt liegende Zellen aufeinander zu, wodurch einzelne Zellnester entstehen, die wiederum an ihrer Peripherie aufeinander zuwachsen. Hierbei sind die Fibroblasten in strang- und palisadenartigen, teilweise radiär verlaufenden Formationen angeordnet. Diese Zellformationen sind mit zunehmender Zelldichte ausgeprägter, wodurch sich dieser Eindruck licht- und elektronenmikroskopisch verstärkt. Je dichter die Zellen aneinander liegen, umso mehr werden sie durch Orientierung an den Nachbarzellen ausgerichtet (Abb. 23). Schon hinsichtlich dieser Zellformationen lassen sich die Fibroblasten gut von den Keratinozyten, die ein pflastersteinförmiges Relief aufweisen, unterscheiden. Auf allen Oberflächentexturen sind diese Zellformationen mehr oder weniger deutlich ausgeprägt nachzuweisen.

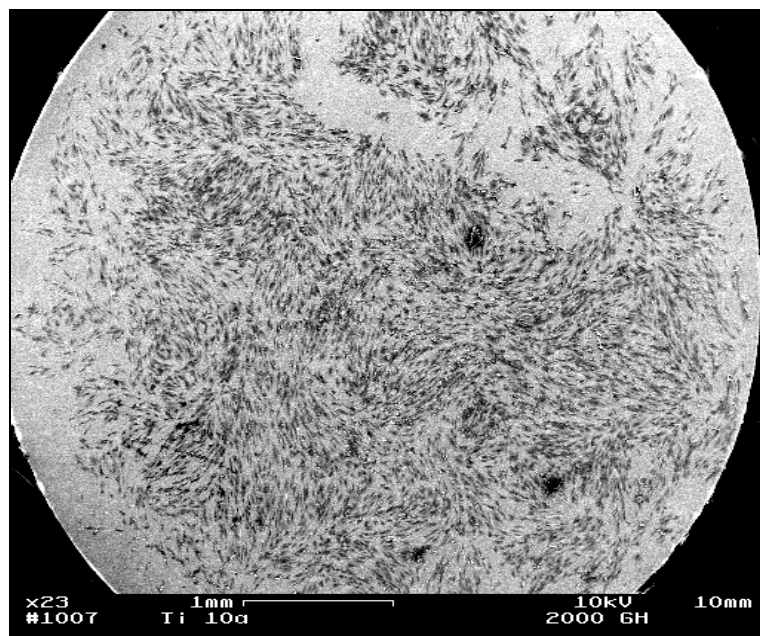


Abb. 23: Fibroblastenrasen nach dreitägiger Kultivierung auf einer polierten Titanoberfläche, **ohne** RFGDT; die Lücke im Zellrasen bei 12 bis 2 Uhr entspricht einem fixierungsbedingten Artefakt. Der Vergrößerungsfaktor (x 23) ist am unteren Rand der Aufnahme links wiedergegeben.

Durch die diffuse Mikrotexturierung der sand- und kugelgestrahlten Titanplättchen wird allerdings keine *gerichtete* Kontaktführung der Fibroblasten induziert. Die auf diesen Trägern haftenden Fibroblasten sind nach 12-stündiger Kultivierung überwiegend polygonal geformt und nach allen Seiten unterschiedlich breit ausgezogen (Abb. 24).

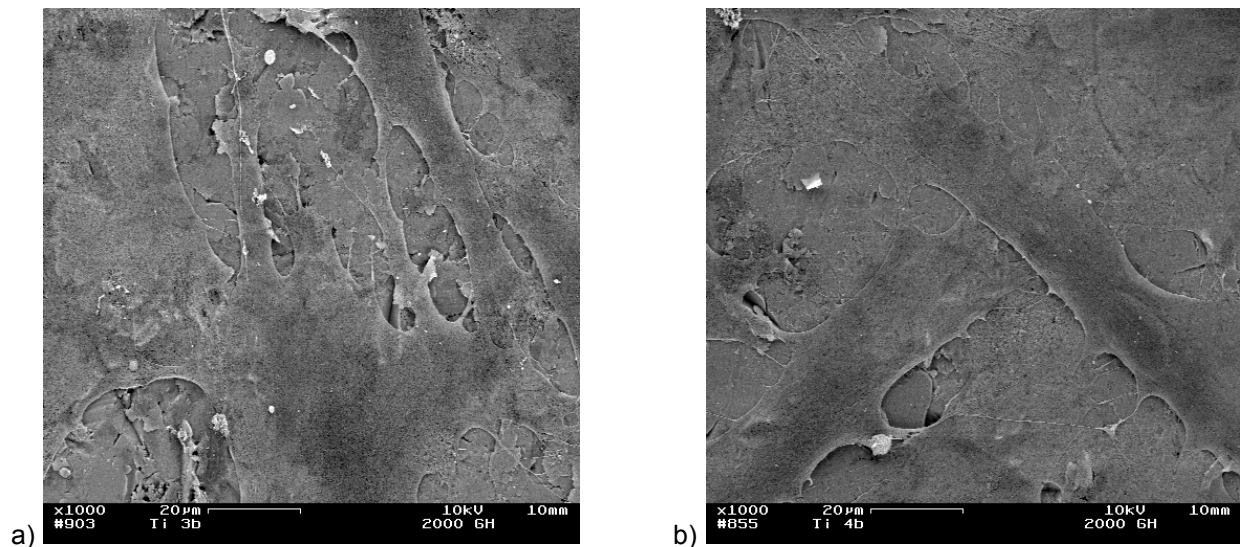


Abb. 24: Polygonal geformte Fibroblasten auf:

- a) sandgestrahlten Titanplättchen (**mit** RFGDT) nach 12 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 1000)
- b) kugelgestrahlten Titanplättchen (**mit** RFGDT) nach 12 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 1000)

Diese Zellgestalt weicht nach 72 Stunden einer länglich ausgezogenen und weitgehend an den Nachbarzellen parallel orientierten Form, wobei das radiäre Muster des Zellrasens z.T. erhalten bleibt (Abb. 25).

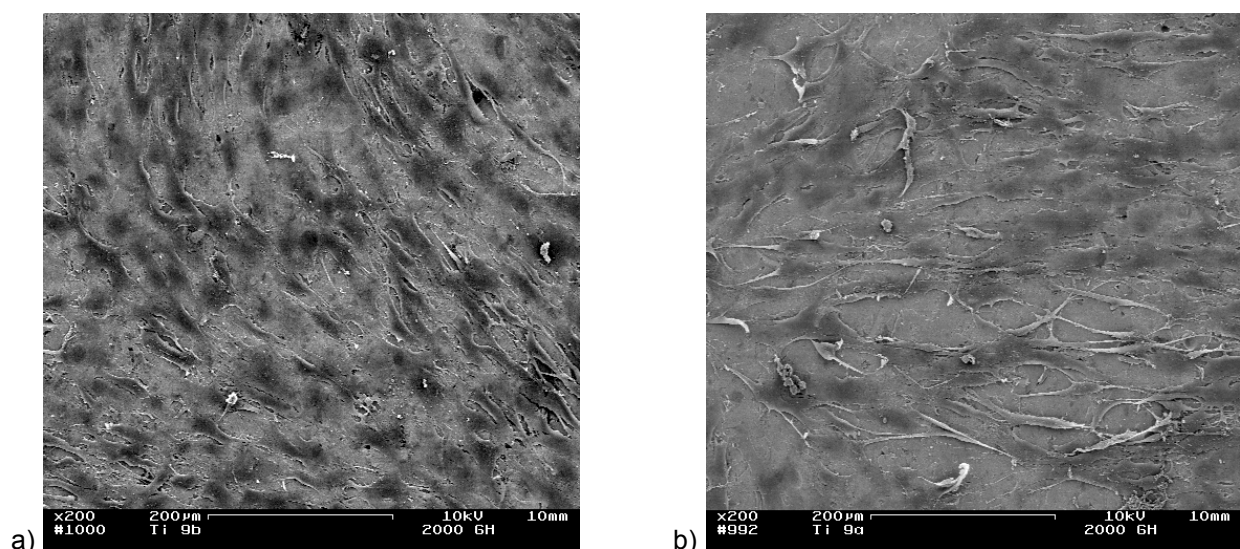


Abb. 25: Parallel orientierte Fibroblasten auf kugelgestrahlten Titanplättchen nach 72 h Kultivierung

- a) **mit** RFGDT, (Vergr.fakt. x 200)
- b) **ohne** RFGDT, (Vergr.fakt. x 200)

Auf den polierten und in geringerem Maße auch auf den kugel- und sandgestrahlten Titanoberflächen bilden die Fibroblasten auffallend viele Aktinfilamente aus, über die sie zur Nachbarzelle wie auch zur Werkstoffoberfläche Verbindungen herstellen (Abb. 26).

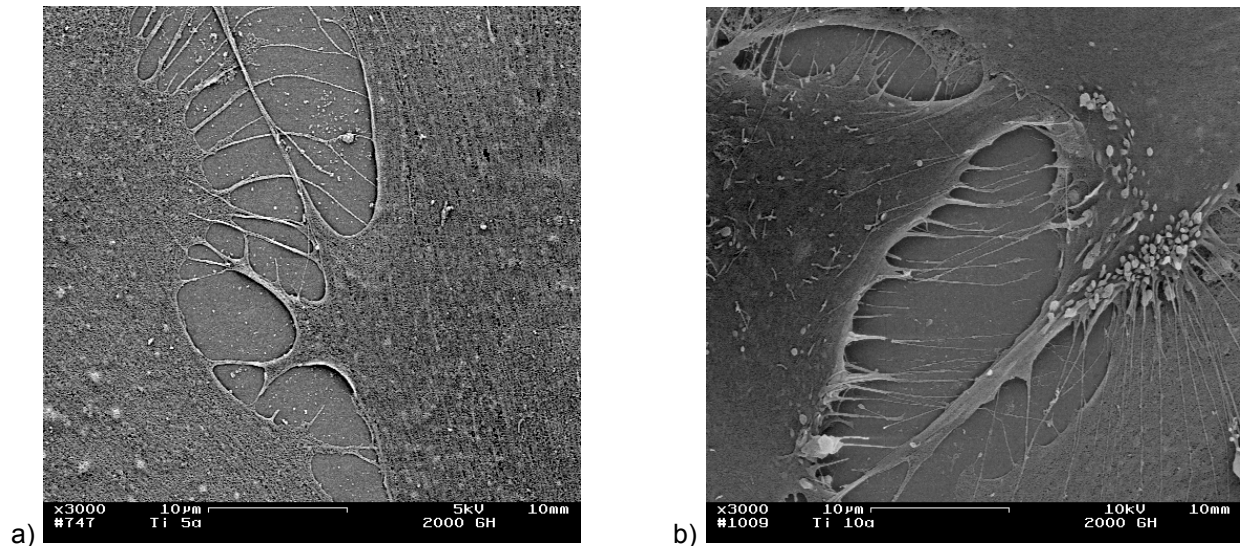


Abb. 26: Fibroblasten mit zahlreichen Aktinfilamenten auf polierten Titanplättchen **ohne** RFGDT, nach 12 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 3000)
nach 72 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 3000)

Auch hier ist nach 72 h Kultivierung die Zellform länglich ausgezogen, und die Zellen sind überwiegend parallel zueinander ausgerichtet (Abb. 27).

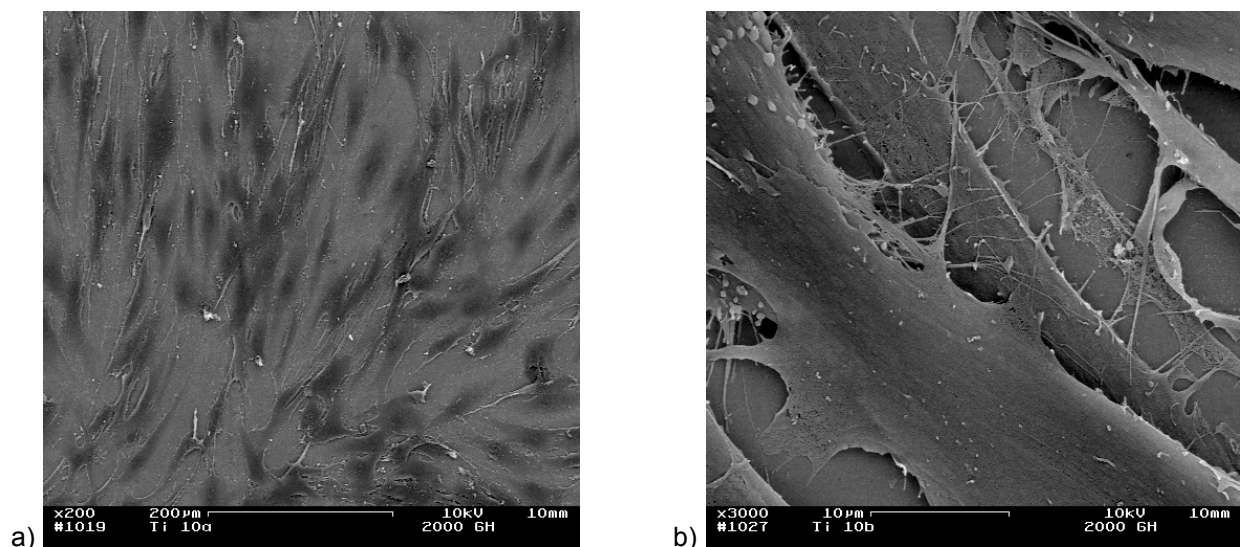


Abb. 27: Parallel aneinander orientierte Fibroblasten auf polierten Titanplättchen nach 72 h Kultivierung:
a) ohne RFGDT, (Vergr.fakt. x 200) b) mit RFGDT, (Vergr.fakt. x 3000)

Die Fibroblasten verankern sich auf den planen bzw. polierten Titanträgern offenbar vorwiegend über die Ausbildung von Aktinfilamenten. Vermutlich bieten plane Texturen weniger Angriffspunkte bzw. Verankerungsstellen für die fokalen Adhäsionen. Insbesondere imponiert hier eine äußerst plane und weit ausgezogene Zellgestalt, deren Zellgrenzen partiell verwischen (Abb. 28). Die Anpassung der Zellen an die plane Oberfläche erscheint perfekt.

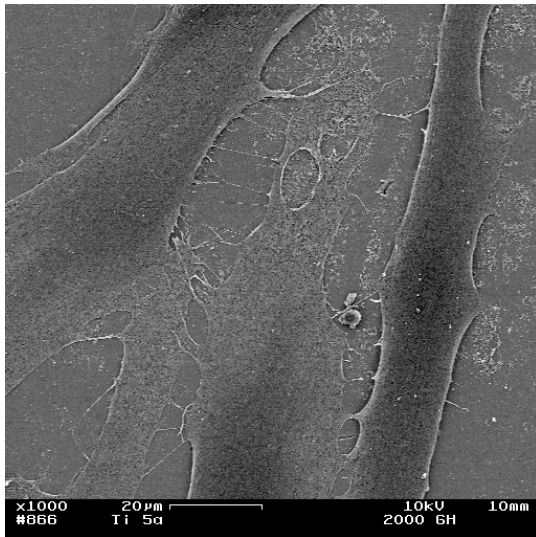


Abb. 28: Plane Fibroblasten mit z.T. verwaschenen Zellgrenzen auf polierten Titanträgern ohne RFGDT nach 12 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 1000)

Auf den kollagenbeschichteten, planen Titanträgern zeigen die Fibroblasten eine nahezu identische Gestalt. Nach 72 h Kultivierung ist hier im Vergleich zu allen übrigen Oberflächen der am stärksten ausgebildete Polylayer zu beobachten (Abb. 29).

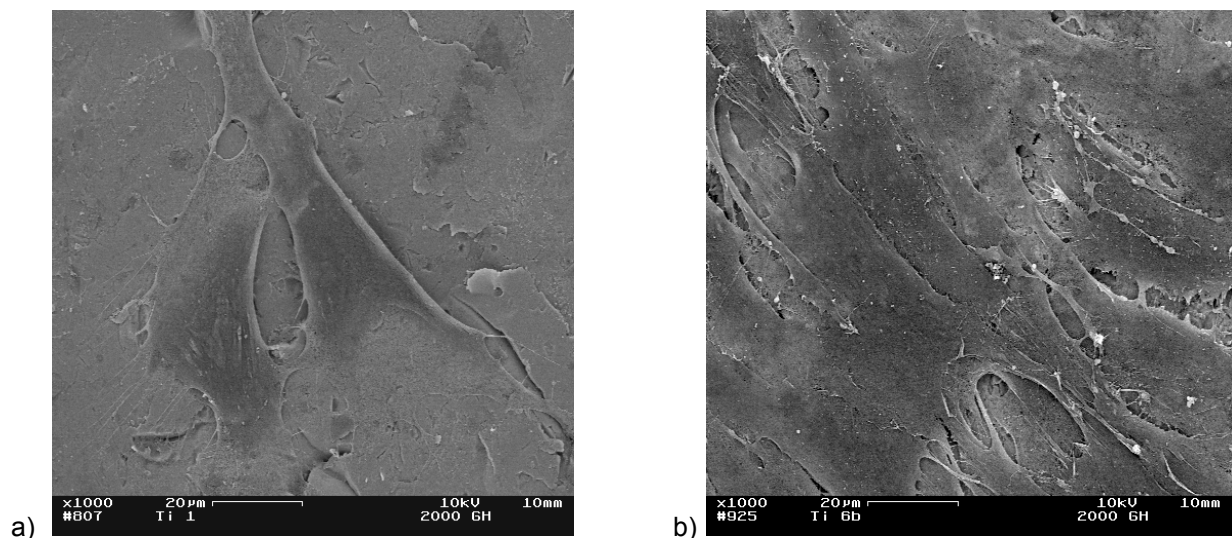


Abb. 29: Plane, polygonale Fibroblasten und kräftiger Polylayer auf kollagenbeschichteten Titanträgern, nach 12 h Kultivierung ohne RFGDT, (Vergr.fakt. x 1000)
nach 72 h Kultivierung mit RFGDT, (Vergr.fakt. x 1000)

Der dünnste Zellrasen findet sich auf den silikonbeschichteten Trägern, hier sind die Zellen geringer längs ausgezogen. Die Fibroblasten tragen einen dichten Mikrovillibesatz und weisen eine teilweise poröse Oberfläche auf (Abb. 30). Dies muss als ein Hinweis für einen toxischen Zellschaden gedeutet werden, wobei nicht zu entscheiden ist, ob dies eine Folge der Silikonoberfläche oder der Fixierung ist.

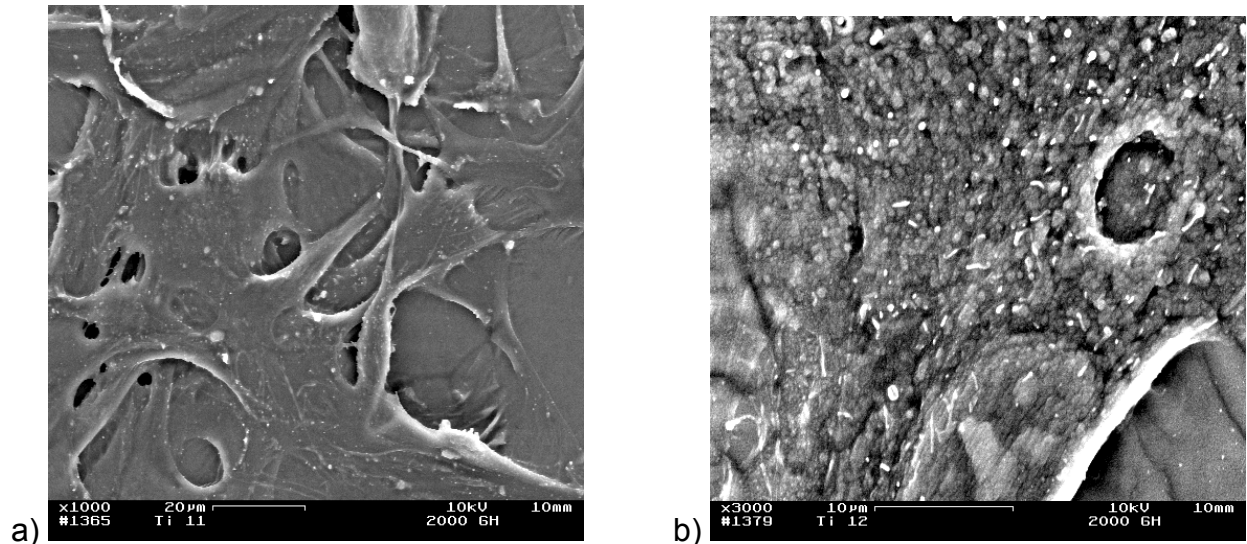


Abb.30: Spärlicher Zellrasen und ausgeprägter Mikrovilli-Besatz bei Fibroblasten auf silikonbeschichteten Trägern, a) ohne RFGDT nach 72 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 1000) b) mit RFGDT nach 72 h Kultivierung, (Vergr.fakt. x 3000)

Bis auf die silikonbeschichteten Träger findet sich nach 72 h auf allen übrigen Oberflächen ein durchgängiger Zellbewuchs und ein Polylyer unterschiedlichen Ausmaßes (Abb. 31)

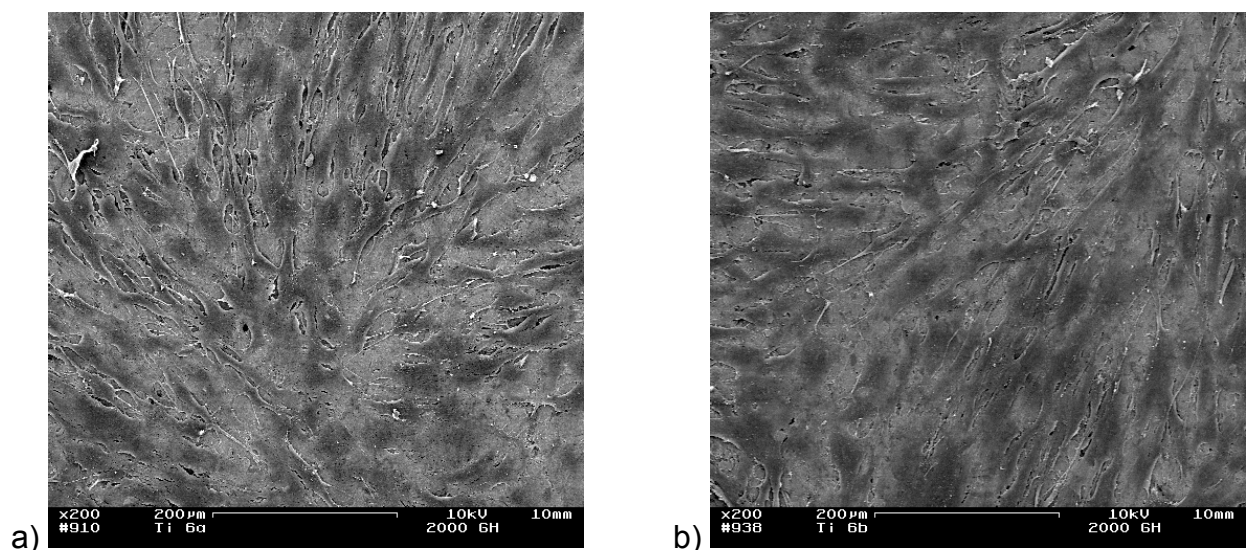


Abb. 31: Typischer und kräftiger Fibroblasten-Polylyer auf kollagenbeschichteten Titanträgern, nach 72 h Kultivierung: a) ohne RFGDT, (Vergr.fakt. x 200); b) mit RFGDT, (Vergr.fakt. x 200)

4.4.2 Qualitative Bewertung des Zellbewuchses

Der Zellbewuchs auf den Trägern wird anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf Grundlage eines Scores (7 Klassen) ausgewertet (Tab. 9), wobei der Grad des Bewuchses jeweils nach 12 h und 72 h beurteilt wird:

- 1 = Titanträger gering, bis 25% bewachsen
- 2 = Titanträger mäßig, 25 - 50% bewachsen
- 3 = Titanträger überwiegend, aber nicht durchgängig, >50% <100% bewachsen
- 4 = Titanträger durchgängig (= 100%) bewachsen,
(Die vollständige Konfluenz aller Zellkolonien ist erreicht, wenn 100% der Titanoberfläche von ihnen bedeckt werden).
- 5 = Titanträger durchgängig bewachsen, stellenweise (< 50%) Polylayer
- 6 = Titanträger durchgängig bewachsen, überwiegend (> 50%) Polylayer
- 7 = Titanträger durchgängig bewachsen, nahezu 100% Polylayer

Tab. 9: Ergebnisse der qualitativen Beurteilung des Zellbewuchses anhand eines 7-Punkte-Scores

	Bewuchs	12h	72h
1	Titanträger gering bewachsen < 50%	Si +RFGD Si	Si +RFGD
2	Titanträger mäßig bewachsen 25 - 50%	P +RFGD C Sa Ku	Si
3	Träger weitgehend bewachsen, > 50% <100%	C +RFGD Sa +RFGD Ku +RFGD P	
4	Träger durchgängig bewachsen		C
5	Träger durchgängig bewachsen, stellenweise Polylayer		P Sa Ku P +RFGD
6	Träger durchgängig bewachsen, >50% Polylayer		K +RFGD Sa +RFGD
7	Träger durchgängig bewachsen, nahezu 100% Polylayer		C +RFGD

Ku = kugelgestrahlt

Sa = sandgestrahlt

P = poliert

Si = silikonbeschichtet

C = kollagenbeschichtet

RFGD = Radio-frequency-glow-discharge

Der Ergebnisvergleich des anhand des obigen Scores *qualitativ gewichteten* Zellbewuchses mit dem durch Zellzählung quantitativ ermittelten tatsächlichen Bewuchs zeigt graphisch eine starke Ähnlichkeit der Werteverteilungen nach 12 bzw. 72 Stunden. Dies wird durch die Polarplot-Darstellung (Abb. 32, 33) veranschaulicht.

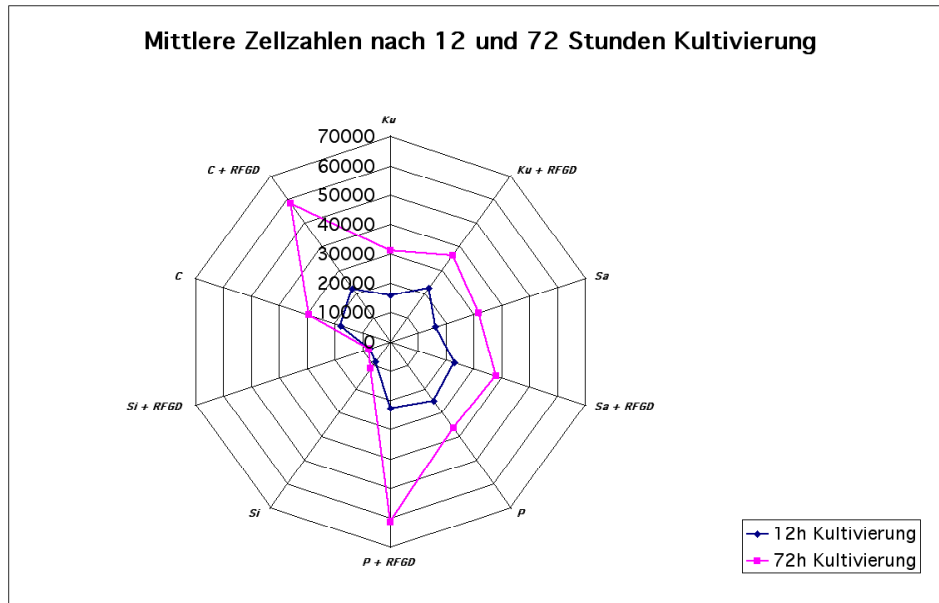


Abb. 32: Quantitativ, anhand der gemessenen Zellzahlen gewichteter Bewuchs nach 12 und 72 Stunden

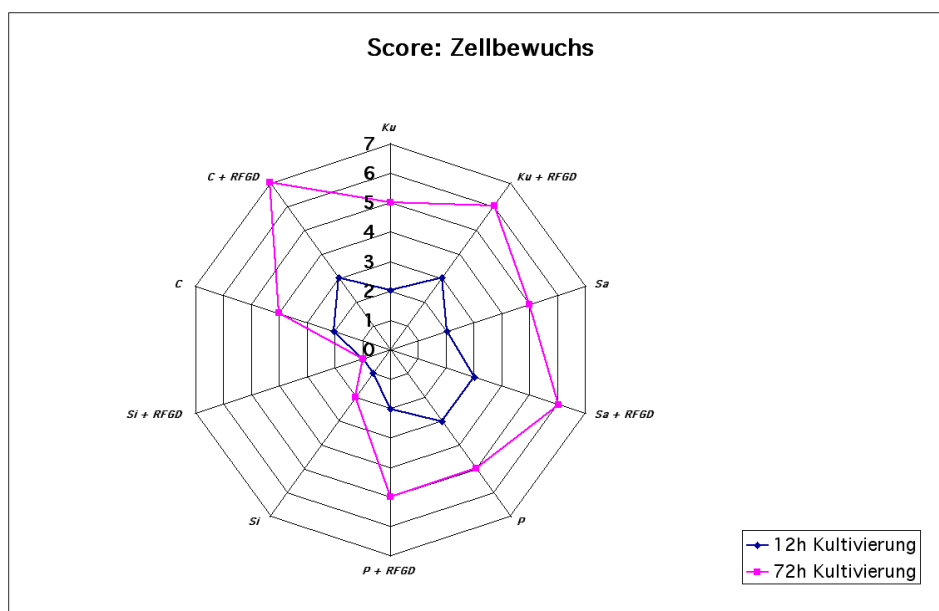


Abb. 33: Qualitativ, anhand des o.a. Scores gewichteter Zellbewuchs nach 12 und 72 Stunden

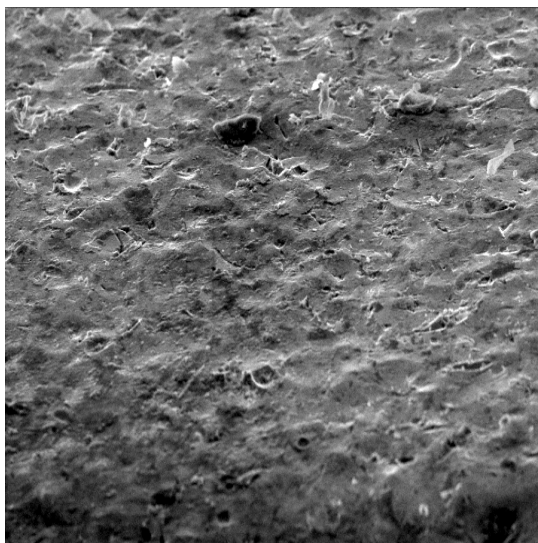
Bezüglich der *12-h-Werte* decken sich die Ergebnisse der deskriptiven, elektronenmikroskopischen Auswertung der Bewuchsraten weitgehend mit den durch die Zellzählung ermittelten Resultaten. Beide Untersuchungen zeigen bei Kollagen A-dotierten und RFGD-behandelten Titanoberflächen den besten Proliferationseffekt (72-h-Wert).

Ebenso schneiden die silikonbeschichteten Träger bezüglich der 12- und 72-h-Werte am schlechtesten ab. Jedoch scheinen in der qualitativen Beurteilung des Zellbewuchses nach 72 Stunden die sand- und kugelgestrahlten und zusätzlich RFGD-behandelten Träger den RFGD-behandelten, polierten Trägern überlegen. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen der Zellzählung, die bezüglich der beiden erstgenannten Oberflächen zu einem umgekehrten Resultat kommt. Mit Hilfe der qualitativen Bewuchsanalyse lässt sich somit mit größerer Sicherheit die zu erwartende Zellanhaftung als die zu erwartende Zellproliferation auf den diversen Oberflächen prognostizieren.

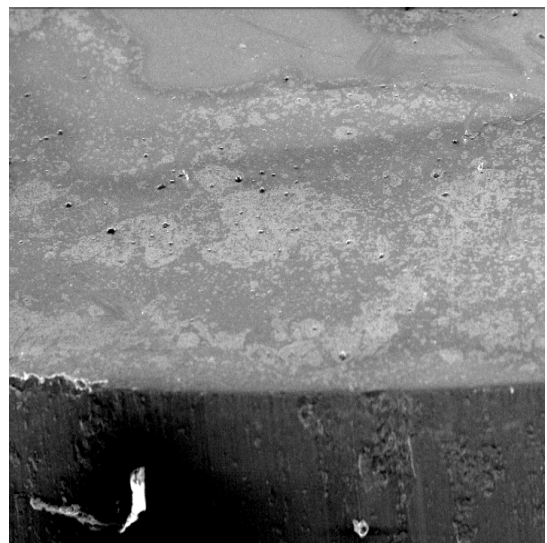
4.5 Werkstoffanalyse

4.5.1 Oberflächen der Titanplättchen

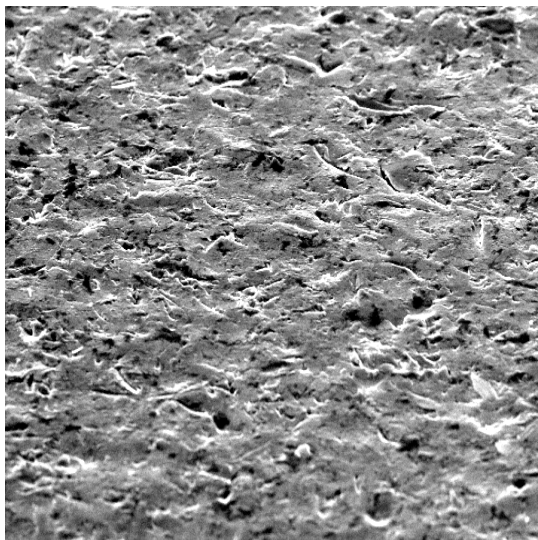
Die Oberflächen der sand- und kugelgestrahlten Plättchen zeigen in der Elektronenmikroskopie ein äußerst ähnliches Bild von Tälern und Wellen, wobei sich zwischen beiden Oberflächenarten, bedingt durch eine teilweise tiefere und kantigere Furchung der sandgestrahlten Texturen, ein diskreter Unterschied ergibt.



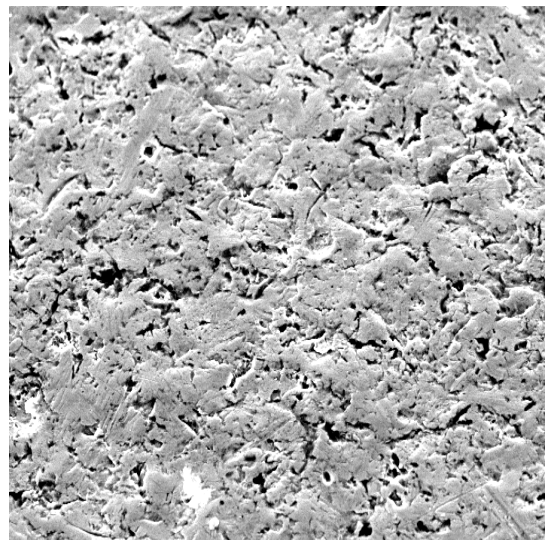
a) kugelgestrahlte Titanoberfläche



b) polierte, z.T.verschmutzte Titanoberfläche



c) sandgestrahlte Oberfläche (Plättchen)



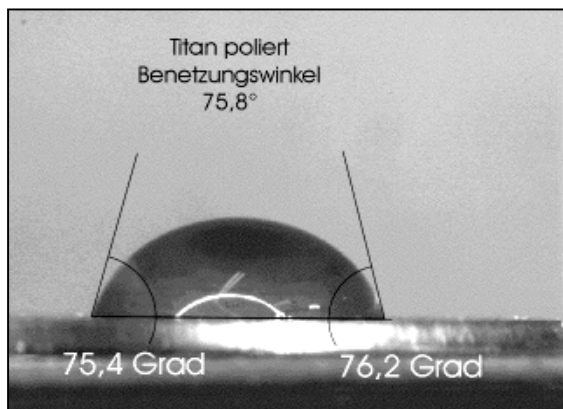
d) sandgestrahlte Oberfläche (Abutment)

Abb. 34: Elektronenmikroskopische Darstellung der unterschiedlichen Titanoberflächen

Den bei sand- und kugelgestrahlten Titanplättchen gleichartigen Oberflächentexturen entsprechend, zeigen Fibroblasten auf diesen Trägern ein identisches, diffuses Orientierungsverhalten; eine *gerichtete* Kontaktführung der Fibroblasten ist nicht erkennbar.

4.5.2 Benetzbarkeit modifizierter Titanplättchenoberflächen

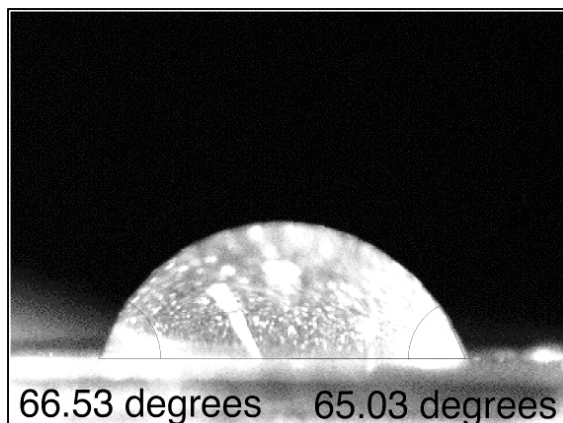
Die Benetzbarkeit der verwendeten Oberflächenarten wurde mit Hilfe eines Wassertropfens untersucht und fotografisch dargestellt. Das RFGD-Treatment blieb hierbei aus Ermangelung eines RFGD-Gerätes unberücksichtigt. Die rechnergestützt ermittelten Kontaktwinkel veranschaulichen nachfolgende Abbildungen.



a) poliert



b) silikonbeschichtet



c) sandgestrahlt

Abb. 35: Benetzungswinkel eines Wassertropfens auf drei verschiedenen oberflächenmodifizierten Titanplättchen (Photos angefertigt von Herrn Dipl.-Ing. M. Meyer, Institut für nicht-metallische Werkstoffe, TU-Berlin)

Die Abbildungen (Abb. 35 a - c) zeigen eine schlechte Benetzbarkeit der silikonbeschichteten Titanplättchen ($\vartheta = 93^\circ$), eine mäßige bei den polierten ($\vartheta = 75,8^\circ$) und die beste Benetzbarkeit bei den aufgerauhten bzw. sandgestrahlten Trägern ($\vartheta = 65,8^\circ$). Bezüglich der Benetzbarkeit von silikonbeschichteten Trägern besteht eine Analogie zu den Ergebnissen nach 12 und 72 Stunden, bei denen die silikonbeschichteten Oberflächen die niedrigsten Zellzahlen aufweisen. Trotz einer schlechteren Benetzbarkeit der planen gegenüber den aufgerauhten Oberflächen zeigen erstere jedoch die höchsten Zahlen adhärenter Zellen. Die Benetzbarkeit allein ist offenkundig eine nur untergeordnete Einflussgröße auf die zu erwartende Zellhaftung.

4.5.3 Spurenelementanalyse

Die an der TU-Berlin durchgeführte Vergleichsanalyse der Titanplättchen mit den klinisch verwendeten Brånemark-Hülsenimplantaten weist nur geringfügige Unterschiede bezüglich der Konzentration an Spurenelementen nach:

Tab. 10: Konzentrationen von Spurenelementen bei Titanplättchen und Titanabutments

Probe	Al	V	Nb	Fe	Ni	Mg	Cu	Pb	Co	Mn	Ba	Cr
Ti Plättchen ³	7420	193	415	722	109	<15	nw	987	<70	<40	<15	120
Ti-Abutment	8413	122	440	622	168	<15	nw	1069	68	<15	nw	213

ICP-Messung Angaben in ppm, nw. nicht nachweisbar

Der Titangehalt bei beiden Materialien beträgt jeweils mehr als 99%.

³ Hersteller Fa. Gemmel, Berlin

5 Diskussion

5.1 Diskussion des Materials

Auf organotypische Keratinozytenkulturen und Kokulturen mit Fibroblasten, die eine weitergehende natürliche Differenzierung ermöglichen (Fusenig 1992) und somit ein besseres Modell der Haut darstellen, wurde wegen der größeren Anzahl von möglichen Störgrößen verzichtet, weil diese eine Standardisierung der Testmethode erschweren oder gar unmöglich machen können. Auch im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen der Adhäsion und Proliferation von Keratinozyten an diversen Titanoberflächen wurde einer Monozellkultur der Vorzug gegeben. Man muss jedoch berücksichtigen, dass sich derartige Zelllinien von den Eigenschaften ihrer Ursprungszellen unterscheiden. Ein Unterschied betrifft dabei die verminderte bzw. ausbleibende Kontakthemmung durch andere Zellen des Umgebungsgewebes.

Die Verwendung von Hautzellen, die direkt von menschlicher Haut isoliert werden, hat gegenüber der Verwendung von tierischen Zellen den Vorteil, dass die Ergebnisse nicht erst auf Ergebnisse von Zellen menschlicher Herkunft übertragen werden müssen. Von Nachteil ist aber die mangelhafte Homogenität und Standardisierbarkeit von Zellen individueller Spender mit sehr unterschiedlichen Hauteigenschaften. Hautzelllinien von Mammaliern sind einfach zu handhaben, bereiten jedoch bei der Kultivierung Schwierigkeiten, da sie leichter von unerwünschten Keimen befallen werden können.

Die anfänglich verwendeten Abutmenttypen sind sämtlich konventionelle Brånemark-Hülsenimplantate (Fa. Entific Medical Systems) und werden nur poliert geliefert. Werkstoffe mit in dieser Studie verwendeten Oberflächenmodifikationen sind kommerziell nicht erhältlich und wurden eigens für die Versuche angefertigt. Wenngleich ursprünglich angestrebt wurde, das Adhäsionsverhalten von Fibroblasten an handelsüblichen, halbierten Titan-Abutments zu untersuchen, so wurden wegen der Möglichkeit eines seitlichen Abgleitens der Fibroblasten von den konvexen Oberflächen statt der Abutmenthälften plane Titanplättchen verwendet. Diese bestehen aus einem nahezu identischen Werkstoff, dem Rein-Titan. Die im Hauptversuch verwendeten Titanplättchen weisen nur geringfügige Unterschiede der Konzentrationen von Spurenelementen und ein gleichartiges Verteilungsmuster dieser Elemente auf. Die gewonnenen Resultate können daher auf das Wachstumsverhalten von Fibroblasten an Brånemark-Hülsenimplantaten (Abutments) übertragen werden. Eine solche

Vergleichbarkeit wird auch durch Studien der Arbeitsgruppe von KELLER und Mitarbeitern bestätigt, die ein identisches Ausmaß von Zelladhäsion und –anpassung an unterschiedlichen Titanoberflächen nachwiesen (Keller, et al. 1994).

Da Titan als gut bioverträglich gilt (Albrektsson, et al. 1983;Albrektsson, et al. 1981;Trentz, et al. 1997), ist es der konventionelle Werkstoff extra- und intraoraler Implantate, zu denen die hier verwendeten Distanzhülsen zählen. Wenngleich Titan die Anhaftung der Haut ermöglicht (Powers, et al. 1986), kann diese wegen des Elastizitätsunterschiedes von Titan gegenüber Haut in der Dreiphasenlinie leicht abreißen (Daly 1980). Daher ist Titan für Hautdurchleitungen weniger gut geeignet. Mechanische Scherkräfte werden als die Hauptursache für das Auftreten von Zellnekrosen im Gewebe-Implantat-Interface angesehen (Rosengren, et al. 1999). Diesen Kräften versucht man einerseits mittels Oberflächenmodifikationen (Chehroudi, et al. 1990;Chehroudi, et al. 1991;Chehroudi, et al. 1989), die zu verbesserter Haftung des Umgebungsgewebes führen sollen, und andererseits während der Phase der Wundheilung mit Hilfe von Scheiben, die einen direkten Haut- und Weichgewebsandruck auf das Periost erzeugen, entgegenzusteuern (Klein, et al. 1999a).

Titan als ein oft eingesetztes Biomaterial weist eine gute Resistenz gegen Korrosion auf (Albrektsson, et al. 1983). Die Korrosionsfestigkeit wird durch eine Passivierungsschicht an der Oberfläche gewährleistet, welche sich in feuchter Umgebung und bei Beschädigung rasch neu bildet und durch anodische Oxidation verstärkt werden kann (Gilbert, et al. 1998;Newesely 1981).

Experimentell wurde Titan transkutan in die Bauchwand eingesetzt (Rostlund und Thompson 1990;Thomsen und Bjursten 1982). Ein Titanfasergeflecht wird als Alternative zu den subkutanen Dacronvelour- und Dacronfilzmanschetten vorgeschlagen, weil es weniger Fremdkörper- und Entzündungsreaktionen hervorruft (Paquay und Ruijter 1994). Ungeachtet ihrer großen Oberfläche konnten bei in der Peritonealhöhle platzierten Linksherzunterstützungssystemen, Pumpen mit einer Oberfläche aus einer Titanlegierung (T-6Al-4V), selbst nach bis zu 153 Tagen keine Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen gefunden werden, auch nicht nach Anwendung von immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungsmethoden (Capek und Kadipasaoglu 1992). Histologische Untersuchungen von im Trommelfell implantierten Titanröhrchen bestätigten die ausgezeichnete Bioverträglichkeit des Titans. Auch POWERS et al. zeigten anhand histologischer Untersuchungen von im Trommelfell implantierten Titanröhrchen auf, dass Zeichen einer akuten oder

chronischen Entzündung ausblieben und dass sich das Epithel direkt an die Titanoberfläche anlagerte (Powers, et al. 1986). Dahingegen wurde in einer von MOSTARDI et al. durchgeführten Studie der Fibroblastenreaktion auf Titan-Abriebpartikel bei Endoprothesen eine von einer Schwellendosis abhängige Nekrose und Gestaltänderung dieser Zellen nachgewiesen (Mostardi, et al. 1999). Die Ursache hierfür wird mit dem Auftreten von Entzündungsmediatoren bzw. der Freisetzung von Zytokinen während des Prothesenabriebs, bei dem Titanpartikel in Lösung gehen, begründet. Ein solcher Abrieb tritt bei hautdurchgeleiteten Implantaten nicht auf, da hier ein Festkörper-Festkörper-Kontakt nicht zustande kommt. Derartige Titanpartikel sind ungeachtet ihrer Herkunft Mediatoren einer Makrophagenaktivierung (Maloney, et al. 1998). Offensichtlich besteht aber hinsichtlich der Reaktion des Umgebungsgewebes auf Fremdkörper ein Unterschied zwischen hautdurchgeleiteten und komplett inkorporierten Implantaten. Dies wird damit erklärt, dass bei Hautdurchleitungen die mangelhafte Versiegelung des Implantats in der Dreiphasenlinie eine Keimpenetration und damit Entzündungen ermöglicht (Große-Siestrup 1998).

Um die unerwünschte Adhäsion von Plaque-Bakterien und Zahnbelag zu verhindern, werden intraoral *polierte* Titan-Abutments verwandt. Extraoral bestehen jedoch andersartige physiologische Bedingungen, insbesondere findet sich hier eine differente saprophytäre Bakterienflora. Eine keimdichte Versiegelung mit den herkömmlichen, polierten Hülsenimplantaten gelingt extraoral nicht (Toljanic und Morello 1995).

SALTHOUSE wies in vivo auf rauhen Teflon-Oberflächen eine gegenüber glatten Oberflächen desselben Materials vielfach höhere Anzahl von Makrophagen nach. Diese Affinität der Makrophagen gegenüber *rauh*en Oberflächen wurde auch in vitro beobachtet. SALTHOUSE konnte nachweisen, dass Makrophagen die Fibroblastenaktivität und hierdurch indirekt die Kollagensynthese und damit die Gewebeorganisation und –ausformung kontrollieren. Während nach einem Monat auf glatten Implantatoberflächen die Makrophagen nicht mehr nachweisbar waren und sich eine dünne Bindegewebskapsel ausgebildet hatte, ließen sich an rauhen Oberflächen noch nach drei Monaten Makrophagen und Riesenzellen nachweisen. Er folgerte daraus, dass glatte Oberflächen bioverträglicher sind (Salthouse 1984).

Die Verwendung von *sand-* und *kugelgestrahlten* Werkstoffen erfolgte unter Berücksichtigung thematisch ähnlich gelagerter Untersuchungen, in denen aufgezeigt wurde, dass es auf mikrotexturierten und damit *oberflächenvergrößerten* Titanoberflächen zu einer verbesserten Anhaftung von Zellen verschiedener

Körpergewebe kommt (s.a. Kap.1.8) (Chehroudi, et al. 1990; Chehroudi, et al. 1991; Chehroudi, et al. 1989; Gipson und Grill 1983).

Hierbei sei insbesondere auf die Darstellung von BRUNETTE verwiesen, in der vier mögliche Ursachen zellulärer Beeinflussung durch Oberflächentopographien von Implantaten eingehend beschrieben werden (Brunette 1988; Grinnel, et al. 1987). Das Phänomen der *Kontaktführung* bedingt die Ausrichtung der Zellen speziell kollagener Fasern auf Implantatoberflächen mit feinen Furchen und Rillen (Chehroudi, et al. 1992; Ohara und Buck 1979). Als *Rugophilie* wird die Tendenz z.B. von Makrophagen bezeichnet, rauhe Oberflächen zu bevorzugen (Salthouse 1984). Der *Zwei-Zentrum-Effekt* beschreibt das Phänomen, dass sich Zellen auf Substraten, welche unterschiedliche Haftungseigenschaften aufweisen, in Richtung des Areals mit hohen adhäsiven Eigenschaften orientieren und solche mit nur schlechter Haftung meiden. Dieses Verhalten der Zellen ist für die Akzeptanz eines Fremdkörpers (*Zell-zu-Fremdkörper-Adhäsion*) von entscheidender Bedeutung, da sich bei einem Werkstoff mit nur geringen adhäsiven Eigenschaften die Zellen überwiegend aneinander orientieren (*Zell-zu-Zell-Adhäsion*) und damit eine Abkapselung des Implantates herbeiführen können. Die dabei stattfindende gerichtete Zellbewegung auf Fremdkörperoberflächen in Abhängigkeit vom Adhäsionsgradienten wird als *Haptotaxis* bezeichnet (Carter 1965). Das Adhäsionsverhalten verschiedener Zellspezies wird folglich durch diverse Oberflächenmodifikationen ganz unterschiedlich beeinflusst und kann durch diese verbessert werden.

Oberflächentopographie und *-chemie* spielen eine kritische Rolle bei Adhäsionsvorgängen an Biomaterialien (Baier 1970). Diese *Oberflächencharakteristika* betreffen:

- die *Porosität*, welche z.B. das Verhalten von in einer organotypischen Zellkultur gezüchteten Endothelzellen beeinflusst (Brunette 1988), die Neovaskularisation der das Implantat umgebenden Bindegewebskapsel induziert und den Transport kleiner dem Blut entstammender Moleküle steigert (Sharkawy, et al. 1998);
- die *Oberflächentopographie*, die einerseits die Osteoblastendifferenzierung und –proliferation sowie die Matrixbildung (Martin, et al. 1995), und andererseits die Formung, Orientierung und das Wachstum von Fibroblasten der Haut stimuliert, indem die Oberflächenstrukturen an den fokalen Adhäsionspunkten der Zellen einwirken (Kononen, et al. 1992);

- die *Oberflächenladung*, die beispielsweise die Fibroblastenproliferation auf Hydroxyethylmethacrylat-Kopolymeren steigert (Hattori, et al. 1985);
- die *Benetzbarkeit* von Materialoberflächen als eine weitere Einflussgröße bei Adhäsionsvorgängen, welche die Anhaftung humaner Fibroblasten und Endothelzellen sowie die Plasmaeiweißadsorption beeinflusst (Ruardy, et al. 1995).

Die Oberflächentopographie wird als eine entscheidende Einflussgröße bei vielen Entwicklungsprozessen betrachtet. Zelluläre Eigenschaften wie die Formierung des Zytoskeletts, die Zelladhäsion und die Interaktion mit anderen Zellen sind Faktoren, welche die Fähigkeit einer Zelle zur Anpassung an eine Oberfläche bestimmen (Clark, et al. 1990). Materialspezifische Charakteristika scheinen hierbei den von den Oberflächentexturen hervorgerufenen Orientierungseffekt auf die Zellen nicht zu beeinflussen (den Braber, et al. 1998).

Im Allgemeinen führen hydrophile Oberflächen zu einer verbesserten Zellaffinität, wohingegen die Proteinadsorption durch hydrophobe Oberflächen gefördert wird (Altankov und Groth 1994; Kothari, et al. 1995; Weiss und Blumenson 1967). Neue Biomaterialien sollen eine gezielte Rekrutierung, Steuerung der Wanderung, Aktivierung und Differenzierung von Zellen sowie Produktion von extrazellulärer Matrix und gegebenenfalls deren Mineralisation ermöglichen (Gross 1993).

Die In vivo Biokompatibilität von *Silikon*implantaten wird zurzeit heftig debattiert. Das Hauptaugenmerk richtet sich auf die ursächliche Beziehung zwischen silikonhaltigen Biomaterialien und der möglichen Entstehung von Autoimmunerkrankungen, was allerdings nicht bewiesen ist. Jedoch ist die Ausbildung einer bleibenden periimplantären Kapsel um das Silikonimplantat das bedeutendere Problem (van Kooten, et al. 1998). Einerseits bestätigten Untersuchungen hinsichtlich der Keratinozytenadhäsion, dass *Silikon* als Polymer besonders gute Haftungseigenschaften besitzt und damit für die Verwendung von Hautdurchleitungen geeignet sei (Große-Siestrup 1998; Knabe, et al. 1997), andererseits konnte in einer elektronenmikroskopischen Studie der Arbeitsgruppe von DEN BRABER nachgewiesen werden, dass die Materialeigenschaften von Silikon keinen Einfluss auf Zellorientierung und Proliferation von Fibroblasten (rat dermal fibroblasts, RDF) ausüben (den Braber, et al. 1998). Zudem wurde eine gegenüber Silikontexturen erheblich höhere Proliferationsrate der Fibroblasten auf Titanoberflächen nachgewiesen (den Braber, et al. 1995). McCAULEY et al. dokumentierten an Fibroblasten der Haut, die Komponenten einer Silikongelprothese ausgesetzt wurden, einen signifikanten

Gestaltwandel und eine zunehmende Abnahme der Zellproliferation (McCauley, et al. 1990). Die niedrigere Proliferationsrate und der Formwandel der Fibroblasten auf Silikonoberflächen wird auch in der hier vorliegenden Untersuchung bestätigt.

In der hier vorgelegten Studie erfolgte die *Kollagenbeschichtung* unter Berücksichtigung der Untersuchungen von O'KEEFE et al., die aufzeigten, dass lösliches, humanes Plasmafibronektin und Kollagen vom Typ I und IV in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Konzentration effektive Agentien für eine verbesserte Zellausbreitung der Hautzellen sind. Das natürliche Vorkommen bestimmter extrazellulärer Matrixproteine im Bereich der Basallamina kann demzufolge für Einheilungsprozesse künstlich eingebrachter Vorrichtungen nutzbar gemacht werden.

Das von uns verwendete Kollagen IV ist eines von vielen Bestandteilen der ECM (Fibronectin, Kollagene, Laminin, Thrombospondin). Kollagen A ist zu 5% in der Laborzubereitung (95%Kollagen I + 5% Kollagen IV) enthalten. Das Kollagen IV sorgt als Bestandteil der Basallamina des Epithels für den Halt des Epithels auf der Dermis.

Die Produktion von Fibronektin bzw. Kollagen und die Zellantwort darauf ist bei Fibroblasten und Keratinozyten die Gleiche und veranschaulicht, dass Fibronektin und Kollagen als Matrixfaktoren für beide Zellspezies fungieren können (O'Keefe, et al. 1985). Beispielsweise interagiert *Fibronectin* mit *biologischen Liganden* wie Fibrinogen, Fibrin, Kollagenen und Glycosaminoglycan, Makromolekülen der Extrazellulärmatrix. CURTIS und McGRATH wiesen bei Beschichtungstests von Kontaktflächen eine verbesserte Adhäsion und ansteigende Zellausbreitung in Gegenwart des „Signalmoleküls“ Fibronektin nach; zu verzeichnen war jedoch ein quantitativer Rückgang dieser Zellaktivitäten bei einer Oberflächenbeschichtung mit bovinem Serumalbumin (BSA), welches ein steter und unverzichtbarer Bestandteil in Nährlösungen für Zellkulturen ist (Curtis, et al. 1992). Die hier vorgestellte Studie kommt zu vergleichbaren Ergebnissen (s.a. Kap. 5.3, S.71).

Typ-I-Kollagen bindet beispielsweise Osteoblasten über spezifische Zelloberflächenrezeptoren, die Integrine. In einer Studie der Arbeitsgruppe von BASLÉ et al. waren auf Kollagen-I-beschichteten Biomaterialien aus Rinderknochen kultivierte Osteoblast-like Cells (Saos-2) in der Form elongiert und entlang der trabekulären Architektur und dem oberflächlichen Kollagengeflecht ausgerichtet. Nach 14 Tagen flossen die Zellen zusammen, die Oberfläche des Biomaterials war durch eine Zelllage bedeckt. Dahingegen zeigten sich auf der Oberfläche des entproteinisierten Biomaterials die Zellen globulär, ohne spezifische Ausrichtung und nur teilweise der Oberfläche

anhaftend. Nach 14-tägiger Kultivierung blieben große Teile der Biomaterialoberfläche unbedeckt. Es ließ sich keine spezifische Verbindung mit dem entproteinisierten Biomaterial erkennen. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass das Vorhandensein von Typ-I-Kollagenfasern im knöchernen Biomaterial eine Bedeutung in der zellulären Adhäsion, der Verbreitung und der Orientierung bei der Interaktion zwischen Typ-I-Kollagen und der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit der Osteoblasten hat (Baslé, et al. 1998). Die Orientierung und Verteilung von Zellen hängt essentiell vom Mechanismus der Zelladhäsion sowie von den Interaktionen zwischen Zellmembran und Unterlage ab (Boyan, et al. 1996).

Da diverse Studien eine wesentliche Beeinflussung der Zelladhäsion durch die Plasmasterilisierung von Implantatoberflächen nachwiesen, wurde das *Radio-Frequency-Glow-Discharge-Treatment* (RFGDT) bei der Hälfte aller Werkstoffe ergänzend angewendet (Baier, et al. 1984; Jansen, et al. 1989). Die Ergebnisse in der Literatur sind allerdings uneinheitlich und widersprüchlich. Nach GROSSE-SIESTRUP führen alle geprüften Variationen der Glimmentladung meist zu einer Steigerung der Zelladhäsion bei Silikon, teilweise wird aber auch eine chemisch bewirkte, verbesserte Adhäsion durch Glimmentladung rückgängig gemacht (Große-Siestrup 1998). Untersuchungen von BAIER et al. demonstrierten, dass Fibroblasten (New Zealand White rabbits) an niedrig geladenen Oberflächen, die mittels stearinsaurer Lösung vorbehandelt oder mit Silikon beschichtet wurden, eine nur geringgradige Zellantwort zeigten. Jedoch erwies sich das RFGD-Verfahren hierbei als eine effektive Methode, anorganische Werkstoffe zu sterilisieren und damit in einen Zustand hoher Oberflächenenergie zu versetzen. Diese Oberflächen korrelierten mit der höchsten Adhäsionsrate (Baier, et al. 1984). Allerdings ist der Grad der Zellanhaftung und –proliferation abhängig von der Anwendungsdauer des Plasmasterilisierungsverfahrens. Die Behandlung mit Argon-Plasma führt zum Entweichen von Sauerstoff, der die Titanoberflächen stets bedeckt. Ebenso entweicht Wasserstoff, dessen Konzentration in der unmittelbar unter der Materialoberfläche liegenden Region abnimmt (Aronsson, et al. 2001).

Die Steigerung der Oberflächenenergie durch das RFGD-Verfahren führt bekanntermaßen zu einer erhöhten Oberflächenspannung, was wiederum die Benetzbarkeit verbessert. Die Benetzbarkeit (*wettability*) ist ein werkstoffseitiger Parameter, der auf den Grad der Zelladhäsion Einfluss nimmt (Baier 1970; Baier, et al. 1984; Schmidt 1999; Weiss und Blumenson 1967). Beträgt der Kontaktwinkel θ

(zwischen Flüssigkeit und Materialoberfläche) weniger als 90° , so spricht man von *Benetzung*, bei einem Kontaktwinkel ϑ von mehr als 90° von *Nichtbenetzung* (s.a. S. 57, 58). Die für diese Studie durchgeführte Untersuchung der Benetzbarkeit wies eine Nichtbenetzbarkeit von Silikon (Kontaktwinkel $\vartheta > 90^\circ$) und eine Benetzbarkeit von planen bzw. polierten ($\vartheta = 75,8^\circ$) sowie durch Sandstrahlung oberflächenvergrößerten Titanoberflächen ($\vartheta = 65,8^\circ$) nach. Dies entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von BAIER et al. (Baier und Meyer 1988). Die in der hier vorliegenden Studie untersuchten silikonbeschichteten Oberflächen zeigten bezüglich der Benetzbarkeit eine Analogie zu den nach 12 und 72 Stunden ermittelten Zellzahlen und wiesen den niedrigsten Zellbewuchs auf. Auf den polierten Titanoberflächen waren trotz einer schlechteren Benetzbarkeit gegenüber aufgerauten Oberflächen die höchsten Zahlen adhärenter Zellen nachweisbar. Offensichtlich spielt die Benetzbarkeit als alleiniger Parameter eine nur untergeordnete Rolle bei der zu erwartenden Zellanhaftung. Physikochemische Parameter wie Oberflächenenergie und Benetzbarkeit beeinflussen zwar das Zellwachstum auf mikrogerillten Oberflächentexturen, haben jedoch keinen messbaren Einfluss die Gestalt und Orientierung der Zellen (den Braber, et al. 1995).

Da die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlichste Werkstoffe bzw. Implantatoberflächen sowie Zellen verschiedener Spezies und Herkunft verwenden, gibt es bislang noch keine standardisierten und damit vergleichbaren Untersuchungen bezüglich des Adhäsionsverhaltens von Zellen an mit dem Glow-Discharge-Verfahren behandelten Werkstoffen. In der Literatur werden einerseits unterschiedliche Plasmasterilisierungsverfahren und andererseits verschieden lange Anwendungszeiten einer solchen physikalischen Oberflächenbehandlung beschrieben.

5.2 Diskussion der Methode

Wie gemeinhin für jedes in vitro Modell Grenzen bestehen und bei der Datenerhebung berücksichtigt und akzeptiert werden müssen, so wurde auch in diesem Modell nur ein Teilaspekt der komplexen Vorgänge an der Grenzfläche zwischen Implantat und Biosystem untersucht. Das Haftungs- und Wachstumsverhalten im Verbund mit anderen Hautzellen und die Implantatumgebung wurden außer Acht gelassen. Die

Einfachheit des hier vorgestellten Modells erlaubt jedoch weitere Untersuchungen des Haftungs- und Wachstumsverhaltens anderer Zellspezies an diversen Werkstoffen in einer standardisierten und reproduzierbaren Umgebung und ermöglicht somit vergleichbare Ergebnisse.

Bei der erforderlichen Versiegelung der Haut im Dreiphasenbereich steht die *Haftung* von Fibroblasten und Keratinozyten im Vordergrund, weshalb man sich methodisch unter Verzicht auf metabolische und biochemische Kriterien auf morphologische Kriterien (Zellzahlen) konzentrieren kann (Baier 1970; Baier und Meyer 1988; Baier, et al. 1984).

Andere Parameter wie die Art und Weise der Implantatapplikation, die Verweildauer des Implantats und die Belastungsverhältnisse am Gewebe-Implantat-Interface sind bei Implantat-Gewebe-Interaktionen gleichermaßen von Bedeutung. Diese können jedoch nur am lebenden Organismus untersucht werden. Schließlich kann aus andersartigen in vitro Bedingungen ein verändertes Zellverhalten resultieren. So zeigen Knorpelzellkulturen einen veränderten Phänotypus, wenn sie nicht wie unter in vivo Verhältnissen zyklischen Belastungen ausgesetzt werden (Larson, et al. 1991; Rosengren, et al. 1999).

Werden in vitro Methoden durch lokale Einflüsse des Biowerkstoffes auf das Umgebungsgewebe sowie durch Wechselwirkungen zwischen Implantat und Wirt kompliziert und überlagert, so ist die Aussagekraft solcher Testmethoden eingeschränkt oder nicht gegeben. Da die Wirkungen körperfremder Substrate auf isolierte Organe oder Gewebe nicht unmittelbar auf die komplexeren Verhältnisse in vivo übertragen werden können, vermögen in vitro Modelle Tierversuche unmittelbar vor der Anwendungsphase am Menschen oftmals nicht zu ersetzen. In vitro Versuche geben jedoch erste Hinweise z.B. auf das Zellverhalten an der Grenzfläche: Implantat-Umgebungsgewebe. Die vergleichende Gegenüberstellung der einzelnen Untersuchungen ermöglicht letztlich richtungsweisende Einsichten.

Um zwischen der Fibroblastenadhäsion und –proliferation unterscheiden zu können, wurden Kultivierungszeiträume von 12 und 72 Stunden gewählt. Von JANSEN et al. durchgeführte Pilotstudien zeigten, dass das Maximum der Fibroblastenadhäsion nach vier Stunden erreicht wird und die Proliferation etwa 24 Stunden nach Zellaussaat beginnt (Jansen, et al. 1991). Hinsichtlich der Zellzählung war zu beachten, dass diese Methode für ältere, geschichtete Kulturen unzuverlässige Ergebnisse liefert. Dahingegen ist die Zellzählung nach Zellisolierung während der ersten Kultivierungstage möglich (Fusenig 1986). Da in dieser Studie relativ kurze

Kultivierungszeiträume von 12 h und 72 h gewählt wurden, ist hier eine Zellzählung zulässig. Die gewählte Methode der Zellzählung zur Bestimmung am Implantat adhärenter Zellen wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen und Autoren erfolgreich angewandt (Große-Siestrup 1998;Hohlfeld 2000;Jansen, et al. 1991;Srivastava, et al. 1990). Um eine Überkonfluenz, die bei Fibroblasten im Gegensatz zu den von KLEIN und HOHLFELD untersuchten Keratinozyten auftritt, sicher zu vermeiden, wurde erstens der Zeitraum, der für die Zelladhäsion zur Verfügung stand, halbiert (von 24 auf 12 Stunden) und zweitens für die Zellkultivierung im Zeitraum der Adhäsion nur die Hälfte und im Zeitraum der Proliferation nur ein Viertel der von KLEIN und HOHLFELD verwendeten Zellmengen eingesetzt (Hohlfeld 2000;Klein, et al. 2000). Die von KLEIN und HOHLFELD durchgeführten Untersuchungen zur Keratinozytenadhäsion und –proliferation an oberflächenmodifizierten Hülsenimplantaten dienten als Vergleichsarbeit, da diese einen ähnlichen Versuchsaufbau wählten und deren Ergebnisse eine notwendige Ergänzung zu der hier vorgelegten Studie darstellen.

Die Grundfläche eines halbierten Abutments ist gering größer als seine Auflagefläche. Die verwendeten 96er-Mikrotiterplatten (Firma Falcon) besitzen einen Durchmesser von $d_{WB} = 6,5\text{mm}$ pro Well. Nach der Formel $F = \pi \times r^2$ ergibt sich eine Wellbodenfläche von $F_{WB} = \underline{33,18\text{mm}^2}$. Die Fläche eines halbierten Abutments berechnet sich nach der Formel:

Fläche nach Längsschnitt (F_{LS}) = Abutmentdurchmesser (d_{Ab}) x Abutmenthöhe(h_{Ab})

$$F_{LS} = d_{Ab} \times h_{Ab} \rightarrow F_{LS} = 4,5\text{mm} \times 4\text{mm} = 18\text{mm}^2$$

Demnach werden 54% der Wellbodenfläche von einer Abutmenthälfte besetzt. Da jedoch die Oberfläche eines Abutments gekrümmt ist, muss dieser Flächenwert nach oben korrigiert werden.

Unter Berücksichtigung des beim Zerlegen durch die Trennscheibe entstehenden Schnittverlustes von 0,5mm pro Abutmenthälfte wird eine solche konvexe Fläche folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} & 0,5 \times \text{Außenfläche Abut } (F_{AH}) \\ &= 0,5 \times \text{Höhe Abut } (h_{Ab}) \times (\text{Umfang Abut } (U_{Ab}) - \text{Schnittverlust}) \\ &= \text{Außenfläche Abutmenthälfte} = 0,5 \times F_{AH} \\ &= 0,5 \times h_{Ab} \times (\pi \times d) - 1\text{mm} = 0,5 \times 4\text{mm} \times (3,14159 \times 4,5\text{mm}) - 1\text{mm} \\ &= 0,5 \times 55,54\text{mm}^2 = \underline{27,27\text{mm}^2} \end{aligned}$$

Die reale, durch eine Abutmenthälfte angebotene Fläche entspricht daher 82% einer Wellbodenfläche, welche tatsächlich für die Anhaftung der Fibroblasten zur Verfügung stand. Die nicht genutzte freie Fläche neben einem Abutment diente als Kontrollzellrasen.

Da die plane Fläche eines Titanplättchens ($F = \pi \times r^2$), welches in den Hauptversuchen die Abutmenthälften ersetzte, 19,63 mm² beträgt, besetzt ein Plättchen nur 59% der Wellbodenfläche. Es kommt also gegenüber den Abutmenthälften zu einem 28%-igen Flächenverlust entsprechend 7,64 mm². Dieser Flächenverlust beeinträchtigt jedoch nicht die Vergleichsmöglichkeit mit den Ergebnissen der Pilotstudie von KLEIN und HOHLFELD (Hohlfeld 2000; Klein, et al. 2000), die bei ihren Versuchen konvexe Abutmenthälften verwendeten. Denn schließlich werden die ermittelten Zellmengen *relativ* zueinander in Beziehung gesetzt.

Um die die Zellhaftung und –proliferation beeinflussenden werkstoffseitigen Parameter (physikalische, mechanische) besser von chemischen bzw. biochemischen Einflussgrößen unterscheiden zu können, wurde auf die Kollagenbeschichtung der sandgestrahlten Werkstoffe verzichtet. Andernfalls hätten zwei Einflussgrößen, nämlich eine (bio-)chemische (Kollagen) und eine mechanische (Oberflächenvergrößerung durch Sandstrahlung), auf das Wachstumsverhalten der Fibroblasten gleichzeitig eingewirkt. Zudem war zu klären, inwiefern eine Kollagen A–Beschichtung allein schon zu einer Verbesserung der Adhäsion und Proliferation bei Fibroblasten führt.

Als statistische Tests kommen in dieser Untersuchung generell nur parameterfreie Tests infrage, also keine t-Tests, da die Daten nicht mit der Normalverteilung verträglich sind. Hierbei kommen oft nur wenige, voneinander verschiedene Zellzahlen vor und die Verteilungen sind nicht symmetrisch. Zur statistischen Beantwortung der Frage nach der besten Oberflächenart bezüglich der Adhäsion (12h-Werte) und des Gesamteffektes von Adhäsion und Proliferation (72h-Werte) eignet sich ein Teilmengen-Auswahlverfahren, das aus mehreren Populationen, die jeweils durch eine Stichprobe vertreten sind, eine Untermenge aussondert, die mit einer hohen statistischen Sicherheit die beste Population enthält. Im vorliegenden Anwendungsfall wird durch das Auswahlverfahren eine Untermenge von Oberflächenarten selektiert, unter denen sich mit hoher statistischer Sicherheit die beste Oberflächenart hinsichtlich der 12- und 72-Stunden-Werte befindet (höchste 12-/ 72h-Werte). Aufgrund der Dateneigenschaften (keine Verträglichkeit mit Normalverteilung) kommt ein *verteilungsfreies Auswahlverfahren*, das *Verfahren von Hsu*, zur Anwendung (Horn und Vollandt 1995).

Die Berechnung der statistischen Sicherheit erfolgt nach der Formel: $1 - \alpha = 1 - 0.05 = 0.95$, wobei Alpha das Signifikanzniveau des Tests repräsentiert. Zeigt das Testergebnis wie im vorliegenden Fall Signifikanz an, so bedeutet dies: Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Signifikanzaussage falsch ist, ist nicht größer als Alpha. Bei der Testentscheidung auf Signifikanz irrt man sich also maximal mit einer Wahrscheinlichkeit von 5%. Der Wert 5% ist eine Schranke, die sich allgemein eingebürgert hat. Im Beispiel des angewendeten Auswahlverfahrens heißt das: Mit einer Wahrscheinlichkeit von maximal 5% ist die in Wirklichkeit beste Oberfläche eine andere als die vom Verfahren als beste ausgewählte.

Will man jedoch statt der 72-Stunden-Werte die Differenzen innerhalb des Zeitraumes von 12 bis 72 Stunden auswerten, so ist das nur möglich, wenn sich jedem einzelnen 12-h-Wert eindeutig ein 72-h-Wert zuordnen lässt, was mit dem vorliegenden Studiendesign nicht realisierbar ist. Daher wird hier die deskriptive Datenanalyse, mit Hilfe derer eine *Tendenz* im Proliferationsverhalten der Fibroblasten erkennbar wird, angewendet.

Neben der lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellkulturen diente die Elektronenmikroskopie zur Darstellung der Zellmorphologie und des Zellwachstums auf den verschiedenartig texturierten Titanträgern. Aufgrund des wegen der hohen Kosten beschränkten Stichprobenumfanges (eine elektronenmikroskopische Abbildung je Vergrößerung, Oberflächenart und Kultivierungsdauer) musste auf statistische Testverfahren der konfirmatorischen Datenanalyse verzichtet werden. Vielmehr wurden die Bilder anhand eines Scores explorativ analysiert, wobei das zeitabhängige Wachstum der Fibroblasten ausgewertet und graphisch in Form eines Polarplots (siehe Kap.4.3.4, S. 45- 55) dargestellt wurde. Es zeigte sich, dass von der Zellmorphologie und der Art des Oberflächenbewuchses Rückschlüsse auf das zu erwartende Ausmaß der Zellanhaftung möglich sind, weniger jedoch auf das Ausmaß der Zellproliferation nach abgeschlossener Adhäsion. Eine solche visuelle Auswertung des Zellbewuchses anhand eines Scores liefert für geschichtete Zellkulturen ungenaue Ergebnisse, da die tiefer liegenden Zellschichten nicht sicher beurteilbar sind. Dies veranschaulichen die mittels Polarplot analog dargestellten, quantitativ (Zellzählung) und qualitativ (Score) ermittelten Ergebnisse (Abb. 32 u. 33, S. 54).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Eine vergleichende Einordnung der Ergebnisse in die bestehende Literatur ist nicht leicht möglich, da einerseits mit unterschiedlichen Zellspezies, und andererseits mit divergenten Versuchsmodellen gearbeitet wurde. Ausgangspunkt der Arbeit waren Untersuchungen von KLEIN und HOHLFELD (Klein, et al. 2000), die eine immortalisierte Zelllinie menschlicher Keratinozyten (HaCat-Zellen) auf verschiedenartigen Titanträgern kultivierten.

In einer Vielzahl von in vitro Tests zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Zellen an diversen Oberflächen werden bis heute unterschiedlichste Materialien wie Silikone, Polystyrene, Perspex, Epoxy, Titane etc. verwendet. Diese Werkstoffe sind bezüglich ihrer Oberflächenchemie und -topographie voneinander deutlich verschieden. Es muss angenommen werden, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich des Zellverhaltens an Oberflächen durch die verschiedenen *Materialeigenschaften* verursacht werden.

Von zahlreichen Autoren, die in ihren Untersuchungen sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten verwendeten, wird die *Oberflächentopographie* als die vorherrschende Einflussgröße hinsichtlich der Zellantwort auf unterschiedliche Materialien und die Kontaktführung als das Resultat einer vorzugsweisen *Proteinadsorption* auf scharfkantigen Oberflächenrauigkeiten betrachtet. Dahingegen konnten WALBOOMERS et al. nachweisen, dass auch eine *plane* titanbeschichtete Polystyrene-Textur eine Kontaktführung induziert. Daraus folgerten sie, dass die Theorie einer vorzugsweisen Proteinadsorption vermutlich nicht gültig ist, dass vielmehr die Kontaktführung von an den Filopodien einwirkenden *mechanischen Kräften* verursacht wird, wodurch die Zellen angeregt werden, Aktinfilamente auszubilden und sich dadurch der Werkstoffoberfläche anpassen (Walboomers, et al. 1999).

Die in dieser Studie durchgeführte Rasterelektronenmikroskopie bestätigt die Ergebnisse von WALBOOMERS und zeigt auf den planen im Vergleich zu den übrigen Oberflächen die ausgeprägteste Spreitung der Fibroblasten; deren Gestalt ist nach allen Seiten hin plan ausgezogen und am deutlichsten abgeflacht. Ebenso findet sich hier die stärkste Ausbildung von Aktinfilamenten. Die Anpassung der Fibroblasten an die plane Titanoberfläche erscheint perfekt.

RÄISÄNEN et al. belegten, dass insbesondere glatte Titanoberflächen für die Adhäsion und Ausbreitung epithelialer Zellen günstigere Bedingungen bieten als nicht metallische

Oberflächen (Räisänen, et al. 2000). Analog zu diesen Ergebnissen zeigen in der hier durchgeführten Untersuchung die Fibroblasten den höchsten Adhäsionsgrad an polierten Titanoberflächen.

Eine zusätzliche RFGD-Behandlung der polierten Titanträger führt zwar nach 12 Stunden zu keiner Steigerung der Zellanhaftung, jedoch nach 72 Stunden sowohl zu den höchsten Proliferationsraten als auch zum stärksten Fibroblastenbewuchs. Nur die RFGD-vorbehandelten plus kollagendotierten planen Titanoberflächen zeigen nach 72 Stunden einen geringgradig stärkeren Fibroblastenbewuchs. Eine Oberflächenvergrößerung und -texturierung durch Sand- und Kugelstrahlung erbringt gegenüber den polierten, nicht RFGD-behandelten Titanplättchen keinen Vorteil. Bei den angerauhten Titanträgern führt jedoch die RFGD-Behandlung zu einer Angleichung der nach 12 Stunden gemessenen Zellzahlen an die Verhältnisse bei den polierten, nicht RFGD-behandelten Trägern, sodass sich keine signifikanten Unterschiede mehr ergeben.

Des Weiteren bestätigt die vorliegende Studie eine eindeutige Überlegenheit der *Titanoberflächen* gegenüber den silikonbeschichteten, bei denen die RFGD-Behandlung zu einer verminderten Adhäsion und Proliferation der Fibroblasten führt. Dies deckt sich mit einer Vielzahl anderer Untersuchungen (den Braber, et al. 1998; den Braber, et al. 1998).

Der elektronenmikroskopische Vergleich der RFGD-behandelten mit den physikalisch unbehandelten Oberflächen dokumentiert zwar (mit Ausnahme bei silikonbeschichteten Oberflächen) den positiven Einfluss der RFGD-Behandlung auf das Fibroblastenwachstum, jedoch ist kein erkennbarer Einfluss auf die Zellorientierung und -gestalt der Fibroblasten nachweisbar. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten von DEN BRABER und Kollegen, die den Effekt der Oberflächenbehandlung mit dem Glow-Discharge-Verfahren an glatten und mikrotexturierten Silikonsubstraten untersuchten (den Braber, et al. 1995).

Die Ergebnisse dieser Studie sind nur eingeschränkt mit denen von KLEIN und HOHLFELD vergleichbar, da diese zur Untersuchung der Keratinozytenadhäsion einerseits eine doppelt so lange Kultivierungszeit, nämlich 24 statt 12 Stunden, anwendeten, und andererseits anstelle der planen Titanträger konvexe Abutmenthälften in ihren Versuchsreihen einsetzten. Überdies wurden einzig RFGD-behandelte Träger (halbierte Abutments) eingesetzt. Physikalisch unbehandelte Träger wurden von KLEIN und HOHLFELD nicht untersucht. Inwieweit also das RFGD-Verfahren für Haftung und

Wachstum von Keratinozyten einen Vorteil gegenüber physikalisch unbehandelten Oberflächen erbringt, liess sich daher nicht entscheiden. Ein Vergleich der Ergebnisse mit polierten, nicht RFGD-vorbehandelten Titanoberflächen ist jedoch sinnvoll, da diese die handelsüblichen Oberflächen bei den gängigen Brånemark-Hülsenimplantaten darstellen.

KLEIN und HOHLFELD kamen zu folgenden Ergebnissen:

- Nach 72 Stunden zeigte sich ein deutlicher Vorteil der Kollagen A-dotierten gegenüber den übrigen Oberflächentexturen. Die RFGD-behandelten, polierten Oberflächen schnitten hier bezüglich der initialen Anhaftung der Keratinozyten und des Gesamteffektes von Adhäsion und Proliferation am schlechtesten ab.
- Eine Oberflächenvergrößerung und -anrauhung führte bei Keratinozyten zu verbesserter Haftung und erhöhtem Bewuchs (Gesamteffekt von Adhäsion und Proliferation).
- Die silikonbeschichteten Oberflächen waren im Hinblick auf die Keratinozyten-adhäsion und -proliferation sowohl den sandgestrahlten als auch den Kollagen A-dotierten deutlich unterlegen, schnitten jedoch besser ab als die polierten Träger. Hierbei war tendenziell erkennbar, dass Polymeroberflächen im Vergleich mit reinen Titanoberflächen zu verbesserter Keratinozytenadhäsion führen können. Jedoch bot eine Silikonbeschichtung gegenüber den angerauhten bzw. sandgestrahlten Oberflächen auch für Keratinozyten keinen nennenswerten Vorteil.

Vergleicht man nun die bei Fibroblasten und Keratinozyten gemessenen Zellzahlen, so ergeben sich folgende Unterschiede (Abb. 36):

- Während eine Oberflächenvergrößerung durch Sandstrahlung bei Keratinozyten zu verbessertem Bewuchs führt bietet diese keinen Vorteil für Fibroblasten.
- Fibroblasten zeigen an polierten Oberflächen das beste Haftungs- und Wachstumsverhalten; dahingegen sind die polierten Oberflächen im Vergleich zu allen übrigen Oberflächen (silikon- u. kollagenbeschichtete, sandgestrahlte) für das Wachstum der Keratinozyten am ungünstigsten.
- An silikonbeschichteten Oberflächen zeigen Fibroblasten das schlechteste Haftungs- und Wachstumsverhalten, jedoch sind Silikonoberflächen insbesondere hinsichtlich des Gesamteffektes von Adhäsion und Proliferation der Keratinozyten den polierten Titanoberflächen überlegen.

- Eine Kollagen-A-Dotierung der Titanoberflächen bietet im Vergleich mit allen übrigen Oberflächen bei beiden Zellspezies bezüglich des Gesamteffektes von Adhäsion und Proliferation den günstigsten Einfluss.

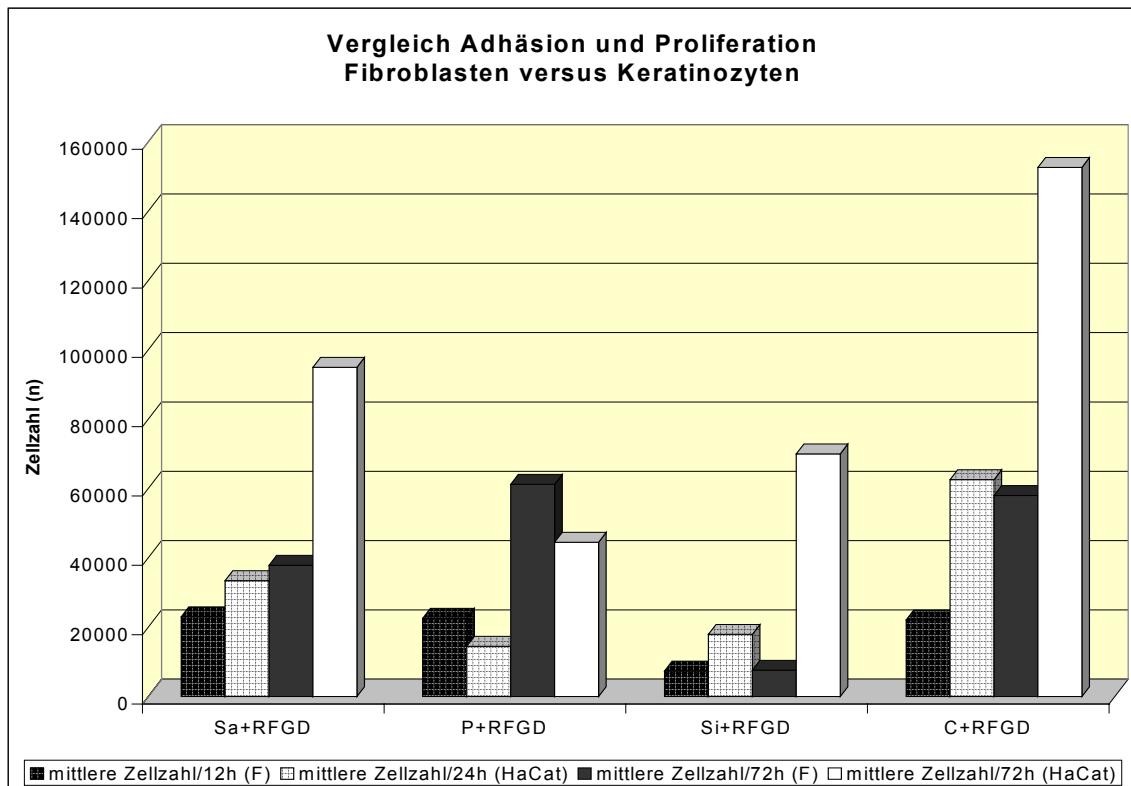


Abb. 36: Ergebnisvergleich beider Studien (Zellzahlen nach 12 bzw. 24h und nach 72h Kultivierung); die schwarzen Säulen repräsentieren die bei Fibroblasten, die weißen Säulen die bei Keratinozyten (KLEIN und HOHLFELD) ermittelten Zellzahlen (auf $1 \times 10^4 / \mu\text{l}$ korrigierte Werte).

In den Untersuchungen zur Keratinozytenadhäsion und –proliferation an oberflächenmodifizierten Hülsenimplantaten wurden lediglich die ermittelten Zellzahlen am Ende der jeweiligen Kultivierungszeiträume verglichen. Die zeitgebundenen Wachstumsvorgänge an der Grenzfläche Werkstoff-Biosystem blieben unberücksichtigt. Über die Proliferationsraten der Keratinozyten im Zeitraum nach erfolgter Zellanhaftung bis zum Ende der Wachstumsphase (72h) wurde keine Aussage gemacht. Da für beide Kultivierungszeiträume (12 h und 72 h) unterschiedliche Zellmengen ($2 \times 10^4 / \mu\text{l}$ und $4 \times 10^4 / \mu\text{l}$) eingesetzt wurden, ließ sich hierüber ohnehin nichts aussagen.

Der Vergleich der Proliferationsraten mit den am Ende der Zellkultivierung gemessenen Zellzahlen ermöglicht es zu erkennen, ob ein ausreichend langer Kultivierungszeitraum zur Beurteilung der auf die Zellproliferation günstig oder ungünstig einwirkenden Oberflächeneffekte gewählt wurde. Denkbar ist nämlich, dass erst nach einem längeren Kultivierungszeitraum eine schlechtere Anhaftung von Zellen an einer Oberfläche durch

eine verbesserte Proliferation wett gemacht wird. Mit anderen Worten: Nach einer gegenüber anderen Oberflächen deutlich gesteigerten Zellproliferation können am Ende dennoch niedrigere Zellzahlen ermittelt werden, wenn der Zeitraum, der zum Ausgleich einer zu Beginn schlechteren Zellhaftung zur Verfügung stand, zu kurz gewählt wurde. So zeigten beispielsweise die *kugelgestrahlten plus RFGD-behandelten* Titanplättchen gegenüber den unbehandelten einen deutlich geringeren Fibroblastenzuwachs im Kultivierungszeitraum zwischen 12 und 72 Stunden, jedoch wiesen sie am Ende einen stärkeren Bewuchs als die physikalisch unbehandelten kugelgestrahlten Titanplättchen auf. Dies ist ein wesentlicher Nebebefund der hier vorgelegten Studie.

Wenngleich eine statistische Analyse der Proliferationsraten aufgrund des in der hier vorliegenden Studie gewählten Versuchsmodells nicht möglich ist, so lässt sich dennoch eine Tendenz im Proliferationsverhalten der Fibroblasten aufzeigen, da für beide Kultivierungszeiträume (12 h und 72 h) die gleichen Zellmengen ($1 \times 10^4/\mu\text{l}$) verwendet wurden.

5.4 Fazit und Ausblick

Mit dem in dieser Studie angewandten Zellkulturmodell lässt sich die Frage, ob eine durch eine spezifische Oberflächenart bedingte, verbesserte Zellhaftung zwangsläufig auch zu gesteigertem Zellwachstum führt, nicht beantworten. Weitere Studien und die Entwicklung eines hierfür geeigneten Studiendesigns sind nötig, dieser Frage auf den Grund zu gehen.

Es ist nicht auszuschließen, dass es in vivo noch zu Veränderungen im Wachstumsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten kommen kann, weil die in dieser Untersuchung verwendeten Kultivierungszeiträume recht kurz gewählt sind und beim lebenden Organismus in den Zeitraum der Entzündungsphase, die der Implantation eines Biomaterials folgt, fallen würden. Eine Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse kann daher erst am lebenden Organismus erfolgen.

Da die Kollagen A-Beschichtung bei beiden Zelltypen, Fibroblasten und Keratinozyten, zu signifikant verbessertem Zellwachstum führt, erscheint eine in vivo Versuchsreihe mit Kollagen-A-beschichteten und RFGD-vorbehandelten Hülsenimplantaten (Abutments) sinnvoll. Überdies ist eine Kollagen A-Dotierung die am einfachsten herzustellende Oberflächenmodifikation.

Die periimplantäre Taschenbildung (durch ausbleibende Kontakthemmung und Herabwachsen des Epithels) wird als wesentliche Ursache für eine Implantatentzündung angesehen, weshalb einer verbesserten Fibroblastenanhaftung besondere Bedeutung zukommt. Da polierte Oberflächen das Wachstum von Fibroblasten am günstigsten, das der Keratinozyten jedoch am ungünstigsten beeinflussen, wäre auch eine sog. zweiphasische Titanoberfläche denkbar. Ein solches Hülsenimplantat bestünde hierbei aus einem polierten Anteil auf Höhe der Dermis und einem sandgestrahlten plus kollagenbeschichteten Anteil im Niveau der Epidermis. Hiermit ließe sich vermutlich das Tiefenwachstum der Keratinozyten am Hülsenimplantat verhindern.

Des Weiteren wäre abzuklären, ob entweder durch verbesserte Zellhaftung am Implantat oder durch vermehrtes Wachstum auf der Implantatoberfläche das Risiko einer periimplantären Entzündung vermindert wird. Vermutlich aber ist hier der Gesamteffekt von Adhäsion und Proliferation der Zellen am Implantat entscheidend.

Die vorliegende Studie vermag nicht zu klären, ob eine anfänglich keimdichte Versiegelung in vivo dauerhaft bestehen bleibt. Hier sind ganz sicher sowohl lokal einwirkende, biomechanische Krafteinflüsse als auch Entzündungsfaktoren von Bedeutung.

Angesichts der nahezu unüberschaubaren Fülle an Studien zur Problematik „Grenzfläche: Implantat-Biosystem“ und der sich laufend verbessernden Technologien erscheint eine Synopse der Fachliteratur der letzten Jahre unentbehrlich. Die Vielzahl der bei Adhäsionsvorgängen beteiligten Einflussgrößen (materialseitige und zellbiologische) erschwert zusätzlich die vergleichende Bewertung unterschiedlicher Implantatwerkstoffe. Umso mehr sind in vivo Testungen von Implantaten unumgänglich. Was zählt, ist letztlich die Entzündungsfreiheit und damit der Implantaterfolg.

6 Zusammenfassung

Bei Hautdurchleitungen besteht durch den iatrogen geschaffenen und permanenten Hautdefekt eine spezifische Problematik in der Dreiphasenlinie, in welcher Implantatoberfläche, Umgebungsgewebe und Luft bzw. Körpersekrete aufeinandertreffen. Hierdurch wird das Eindringen von Keimen in das Gewebe begünstigt. Für den Heilungsprozess im Bereich der Haut sind zwei Gegebenheiten von Bedeutung: erstens der *epitheliale* und zweitens der *bindegewebige* Heilungsprozess. Folglich wird nach einem Biomaterial respektive einer Oberfläche gesucht, welche für Keratinozyten wie auch für Fibroblasten die günstigsten Bedingungen zur Anhaftung und Proliferation am Implantat bietet.

Reintitan ist der einzige bei extraoralen Hülsenimplantaten eingesetzte Biowerkstoff, welcher zwar die Osseointegration, nicht aber eine sichere Implantat-Gewebe-Versiegelung im Niveau der Haut ermöglicht. Um jedoch den klinischen Erfolg von Hautdurchleitungen zu gewährleisten, ist eine ausreichend dichte Material-Gewebe-Versiegelung erforderlich, welche eine Keimpenetration und -invasion und die Ablagerung von Debris in den subepithelialen Gewebeschichten verhindern hilft. Dies gelingt jedoch klinisch bisher nicht. Daher erhofft man sich, mittels Modifikationen der Titanoberflächen eine verbesserte Gewebe-Implantat-Versiegelung erzielen zu können. Vorgestellt wird ein in vitro Modell, das die Untersuchung der Adhäsion, Zellspreitung und Proliferation von humanen Fibroblasten an unterschiedlich oberflächenmodifizierten Werkstoffen unter konstanten und reproduzierbaren Bedingungen ermöglicht.

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien der Keratinozyten-adhäsion und -proliferation wurden fünf verschiedenartig mechanisch und (bio-)chemisch oberflächenmodifizierte Titanplättchen (kugelgestrahlte, sandgestrahlte, polierte, silikon- sowie kollagenbeschichtete) eigens hergestellt und untersucht. Die Hälfte aller Plättchen wurde noch zusätzlich physikalisch mit einem Plasma-sterilisierungsverfahren, dem Radio-frequency-glow-discharge-treatment (RFGDT), vorbehandelt. Hierdurch ergaben sich insgesamt 10 verschiedene Oberflächen. Jeweils zehn Plättchen einer Werkstoffart wurden in Wells einer 96er Mikrotiterplatte eingebracht und nach Auffüllen der Wells durch Nährstofflösung mit 1×10^4 Fibroblasten (humane Fibroblasten) beschickt. Die Fibroblasten konnten so gleichmäßig verteilt auf die Oberflächen der Titanplättchen herabsintern, an diesen adhären und anschließend proliferieren. Zwecks Beurteilung der Adhäsion wurde die Zellkultivierung

nach zwölf Stunden, zwecks Beurteilung der Proliferation nach 72 Stunden abgebrochen. Zur quantitativen Beurteilung des Zellbewuchses wurde die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden abschließend statistisch aufgearbeitet. Parallel erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und qualitative Auswertung des Zellbewuchses anhand eines 7-Punkte-Scores.

Die Studie kommt zu folgenden Ergebnissen:

- Bezüglich der Fibroblasten*adhäsion* ist die Plasmasterilisierung (RFGD-Verfahren) bei kugelgestrahlter, sandgestrahlter und Kollagen-A-beschichteter Oberfläche den physikalisch unbehandelten Oberflächen überlegen, bei Silikonbeschichtung aber von Nachteil.
- Das RFGD-Verfahren ist hinsichtlich des Gesamteffekts von Adhäsion und Proliferation der Fibroblasten bei den gleichen Oberflächen überlegen, außerdem noch bei polierter Oberfläche.
- Die höchsten Zuwachsraten im Zeitraum zwischen 12 und 72 Stunden weisen sowohl die polierten plus RFGD-behandelten als auch die Kollagen-A-beschichteten plus RFGD-behandelten Oberflächen auf.
- Trotz eines niedrigeren Zellbewuchses am Ende einer 72stündigen Fibroblastenkultivierung kann ein höherer Zellzuwachs nach erfolgter Adhäsion vorgelegen haben. Es ist möglich, dass eine schlechtere Anhaftung von Zellen an einer Oberfläche durch eine verbesserte Proliferation wett gemacht wird.
- Die Auswertung der Elektronenmikroskopie bestätigt die quantitativen, zellbiologischen Ergebnisse.

Der Vergleich der vorliegenden Studie mit den Untersuchungen zur Keratinozytenadhäsion und –proliferation zeigt ein zum Teil andersartiges Haftungs- und Wachstumsverhalten der Fibroblasten an gleichartig oberflächenmodifizierten Titanwerkstoffen. Im Vergleich zu allen übrigen Werkstoffoberflächen führt jedoch die Kollagen-A-Dotierung der Titanoberflächen bei Fibroblasten und Keratinozyten gleichermaßen zum größten Ausmaß von Adhäsion und Proliferation.

Aufgrund der Komplexität und Vielzahl an Einflussgrößen, welche sich unter verschiedenen Bedingungen unterscheiden können, ist der detaillierte Vergleich des in vitro und in vivo Zellverhaltens auf mikrotexturierten Materialien problematisch. Weitere Studien sind notwendig, um den bindegewebigen und epithelialen Organisationsprozess in der Implantatumgebung besser verstehen zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Albrektsson, T. (1985): The response of bone to titanium implants, Crit Rev Biocompat [1], Seite 53-84.
2. Albrektsson, T.; Brånemark, P.-I.; Hallen, O. und Lindström, J. (1983): Percutaneous implants of pure titanium, Trans Ann Meet Soc Biomat 6, Seite 1.
3. Albrektsson, T.; Brånemark, P.-I. und Lindström, J. (1981): Transcutaneous titanium implants in clinical practise, European Conference on Biomaterials, Gothenburg, Sweden.
4. Altankov, G. und Groth, T. (1994): Reorganization of substratum on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility, J Mater Sci 5, Seite 732-737.
5. An, Yuehuei H. und Friedman, Richard J. (1998): Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces, J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 43, Seite 338-348. URL: Orthopedic Research Laboratory, Department of Orthopaedic Surgery, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina
6. Aronsson, B.-O.; Hjörvarsson, B.; Frauchiger, L.; Taborrelli, M.; Vallotton, P.-H. und Descouts, P. (2001): Hydrogen desorption from sand-blasted and acid-etched titanium surfaces after glow-discharge treatment, Journal of Biomedical Materials Research 54, Seite 20-29. URL: Group for Applied Physics-Biomedical, University of Geneva, CH-1211 Geneva 4, Switzerland
7. Materialphysics, Royal Institute of Technology, S-100 44 Stockholm, Sweden
8. Symbios Orthopedie SA, CH-1400, Yverdon-les-Bains, Switzerland
9. Baier, R. E. (1970): Surface properties influencing biological adhesion. Adhesion in Biological Systems., Academic Press, Seite 15-48.
10. Baier, R.E. und Meyer, A.E. (1988): Implant surface preparation, Int J Maxillofac Impl [3], Seite 9-20.
11. Baier, R.E.; Meyer, A.E.; Natiella, J.R.; Natiella, R.R. und Carter, J.M. (1984): Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results, Journal of Biomedical Materials Research 18, Seite 337-355.
12. Bakker, D., Daems, W.T.; Blitterswijk, C.A.v.; Hesseling, S.C. und Grote, J.J. (1988): Effect of implantation site on phagocyte/polymer interaction and fibrous capsule formation, Biomaterials 9 [January], Seite 14-23.

14. Banes, A.J.; Tsuzaki, M. und Yamamoto, J. (1995): Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals, *Biochem Cell Biol* [73], Seite 349-365.
15. Baslé, M. F.; Lesourd, M.; Grizon, F.; Pascaretti, C. und Chappard, D. (1998): Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und Verbreitung von Osteoblasten über die β 1-Integrin-Untereinheit, *Orthopäde* 27, Seite 136-142. URL: LHEA, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, rue Haute de Reculée, F-49045 Angers-Cédex
16. Becker, H.; Große-Siestrup, C.; Schurig, R.; Affeld, K.; Gahl, G.M.; Krautzberger, W.M. und Kessel, M. (1983): Die Peritonealdialysekatheter - Eine Übersicht, Bad Homburg, Wissenschaftliche Informationen, Nephrologie, Fresenius Stiftung, 447-461
17. Bereiter-Hahn, J.; Matoltsy, A.G. und Richards, S.K. (1984-86): *Biology of the Integument*, Springer, Berlin.
18. Binon, P. P.; Weir, D. J. und Marshall, S. J. (1992): Surface analysis of an original Branemark implant and three related clones, *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 [2], Seite 168-75.
19. Black, J. (1992): *Biological Performance of Materials*, Marcel Dekker, New York.
20. Blitterswijk, C. A.v.; Bakker, D.; Hesselink, S.C. und Koerten, H.K. (1991): Reactions of cells at implant surfaces, *Biomaterials* 12 [3], Seite 187-193.
21. Boyan, B.; Hummert, T.; Dean, D. und Schwartz, Z. (1996): Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response., *Biomaterials* 17, Seite 137-146.
22. Brånemark, P. I.; Adell, R.; Breine, U.; Hansson, B. O.; Lindstrom, J. und Ohlsson, A. (1969): Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies, *Scand J Plast Reconstr Surg* 3 [2], Seite 81-100.
23. Brånemark, P. I. und Albrektsson, T. (1982): Titanium implants permanently penetrating human skin, *Scand J Plast Reconstr Surg* [16], Seite 17-21.
24. Brånemark, P. I.; Breine, U.; Adell, R.; Hansson, B. O.; Lindstrom, J. und Ohlsson, A. (1970): Experimental studies on intra-osseous anchorage of dental prosthesis, *Arsb Goteb Tandlak Sallsk*, Seite 9-25.
25. Brat, F.; De Zanger, R. und Wisse, E. (1997): Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells., *Journal of microscopy* 186, Seite 84-87.

26. Bray, D.F.; Bagu, J. und Koegler, P. (1993): Comparison of Hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and Critical-Point Drying Methods for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens., *Microsc. Res. Technique* 26, Seite 489-495.
27. Breitzkreutz, D.; Boukamp, P.; Stark, H.-J. und Fusenig, N. E. (1989): Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation, Karger, S., Basel.
28. Britland, S.; Clark, P.; Connolly, P. und Moores, G. (1992): Micropatterned substratum adhesiveness: a model for morphogenetic cues controlling cell behavior, *Exp Cell Res* 198 [1], Seite 124-9.
29. Britland, S.; Perez Arnaud, E.; Clark, P.; McGinn, B.; Connolly, P. und Moores, G. (1992): Micropatterning proteins and synthetic peptides on solid supports: a novel application for microelectronics fabrication technology, *Biotechnol Prog* 8 [2], Seite 155-60.
30. Brunette, D.M. (1986): Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata, *Exp Cell Res* [167], Seite 203.
31. Brunette, D.M. (1988): The Effects of Implant Surface Topography on the Behavior of Cells, *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS* [3], Seite 231-246.
32. Brunette, D.M. und Chehroudi, B. (1999): The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo, *Journal of Biomechanical Engineering* 121 [1], Seite 49-57.
33. Burridge, K.; Fath, K.; Kelly, T.; Nuckolls, G. und Turner, C. (1988): Fokal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton., *Ann. Rev Cell Biol* [4], Seite 487-525.
34. Capek, P. und Kadipasaoglu, K.A. (1992): Human intraperitoneal response to a left ventricular assist device with a Ti-6Al-4V alloy surface., *ASAIO J* 38, Seite M534-M549.
35. Carter, S. B. (1965): Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion., *Nature* 208, Seite 1183-1187.
36. Chehroudi, B.; Gould, T. R. und Brunette, D. M. (1990): Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo, *J Biomed Mater Res* 24 [9], Seite 1203-19.

37. Chehroudi, B.; Gould, T. R. und Brunette, D. M. (1991): A light and electron microscopic study of the effects of surface topography on the behavior of cells attached to titanium-coated percutaneous implants, *J Biomed Mater Res* 25 [3], Seite 387-405.
38. Chehroudi, B.; Gould, T. R. und Brunette, D. M. (1992): The role of connective tissue in inhibiting epithelial downgrowth on titanium-coated percutaneous implants, *J Biomed Mater Res* 26 [4], Seite 493-515.
39. Chehroudi, B.; Gould, T.R.L. und Brunette, D.M. (1989): Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo, *J Biomed Mater Res* [23], Seite 1067-1085.
40. Cheung, LK und Luk, WK (2000): Chemical cleaning of titanium tray for reconstructive surgery., *Br J Oral Maxillofac Surg* 38 [4], Seite 271-6.
41. Clark, P.; Connolly, P.; Curtis, A. S.; Dow, J. A. und Wilkinson, C. D. (1991): Cell guidance by ultrafine topography in vitro, *J Cell Sci* 99 [Pt 1], Seite 73-7.
42. Clark, P.; Connolly, P.; Curtis, A.S.G.; Dow, J.A.T. und Wilkinson, C.D.W. (1990): Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata., *Development* 108 [4], Seite 635-644.
43. Clark, R.A.F. (1985): Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations I., *Journal of the American Academy of Dermatology* 13 [5], Seite 701-725.
44. Coleman, D.L.; King, R.N. und Andrade, J.D. (1974): The foreign body reaction - an experimental protocol, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 5, Seite 65.
45. Cunha, G.R.; Chung, L.W.K. und Shannon, J.M. (1983): Hormone induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions, *Rec Prog Horm Res* [39], Seite 559-598.
46. Curtis, A. S. und Forrester, J. V. (1984): Cell interactions: some critical reappraisals, *Biochem Soc Trans* 12 [3], Seite 538-9.
47. Curtis, A. S. und Forrester, J. V. (1984): Interactions between cells and with intercellular matrices, *Prog Clin Biol Res* 151, Seite 339-43.
48. Curtis, A. S.; McGrath, M. und Gasmi, L. (1992): Localised application of an activating signal to a cell: experimental use of fibronectin bound to beads and the implications for mechanisms of adhesion, *J Cell Sci* 101 [Pt 2], Seite 427-36.
49. Curtis, A.S.G. und Clark, P. (1990): The effects of topografic and mechanical properties of materials on cell behaviour, *Crit Rev Biocomp* [5], Seite 343.

50. Curtis, Adam und Wilkinson, Chris (1997): Review "Topographical control of cells", *Biomaterials* [18], Seite 1573-1583.
51. Daly, B. D. T. (1980): Development of percutaneous energy transmission systems. Annual Progress Report, National Institute of Health, USA, Report No. NO1-HV-8-2919-2
52. den Braber, E. T.; de Ruijter, J. E.; Ginsel, L. A.; von Recum, A. F. und Jansen, J. A. (1998): Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *J Biomed Mater Res* 40 [2], Seite 291-300.
53. den Braber, E. T.; de Ruijter, J. E.; Smits, H. T.; Ginsel, L. A.; von Recum, A. F. und Jansen, J. A. (1995): Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth, *J Biomed Mater Res* 29 [4], Seite 511-8.
54. den Braber, E. T.; Jansen, H. V.; de Boer, M. J.; Croes, H. J. E.; Elwenspoek, M.; Ginsel, L. A. und Jansen, J. A. (1998): Scanning electron microscopic, transmission electron microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata, *J Biomed Mater Res* 40 [3], Seite 425-433.
55. Desmouliere, A. und Gabbiani, G. (1996): The molecular and cell biology of wound repair, Clark, R.A.F. und Henson, P.M., Plenum Press, London.
56. Dunn, G.A. und Brown, A.F. (1986): Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation, *J Cell Sci* [83], Seite 313-340.
57. Dunn, G.A. und Heath, J.P. (1976): A new hypothesis of contact guidance in tissue cells, *Exp Cell Res* 1 [101].
58. Fusenig, N.E. (1986): Mammalian epidermal cells in culture, Breitner-Hahn, J.; Matoltzy, A.G. und Richards, K.S., *Biology of the Integument* Seite 409-442, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
59. Fusenig, N.E. (1992): Cell interaction an epithelial differentiation, Freshney, R.I., *Culture of Epithelial Cells*, Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
60. Gabbiani, G.; Chapponier, C. und Huttner, I. (1978): Cytoplasmatic filaments and gap junctions in epithelial cells and myoblasts during wound healing, *Journal of Cell Biology* 76, Seite 561-568.

61. Gilbert, Jeremy L.; Zarka, Lena; Chang, Elbert und Thomas, Carson H. (1998): The reduction half cell in biomaterials corrosion: Oxygen diffusion profiles near and cell response to polarized titanium surfaces, J Biomed Mater Res 42, Seite 321–330. URL: John Wiley & Sons, Inc.
62. Gipson, I. K. und Grill, S.M. (1983): Hemidesmosome formation in vitro., Journal of Cell Biology 97, Seite 849-857.
63. Gould, T. R.; Brunette, D. M. und Westbury, L. (1981): The attachment mechanism of epithelial cells to titanium in vitro, J Periodontal Res 16 [6], Seite 611-6.
64. Grinnel, F.; Hays, D. J. und Minter, D. (1977): Cell adhesion and spreading factor, Experimental Cell Research 110, Seite 175-190.
65. Grinnel, F.; Toda, K.-I. und Lamke-Seymour, C. (1987): Reconstitution of human epidermis in vitro is accompanied by transient activation of basal keratinocyte spreading, Experimental Cell Research 172, Seite 423-449.
66. Grinnel, Frederick (1978): Cellular Adhesiveness and Extracellular Substrata, Int Rev Cytol 53, Seite 65-144.
67. Gristina, A.G. (1987): Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, Science 237, Seite 1588-1595.
68. Gross, U. (1993): Biologische Aspekte von Implantatmaterialien, Dtsch Zahnärztl Z 12 [48], Seite 750-755.
69. Große-Siestrup, C. (1998): Künstliche Hautdurchleitungen in der Medizin - experimentelle und klinische Untersuchungen-, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin.
70. Guo, M.; Toda, K.-I. und Grinnel, F. (1990): Activation of human keratinocyte migration on type I collagen and fibronectin., Journal of Cell Scienc 96, Seite 197-205.
71. Hall, C. W.; Adams, L. M. und Ghidoni, J. J. (1975): Development of skin interfacing cannula., Trans Am Soc Artif Intern Organs 21, Seite 281-287.
72. Hall, C.W.; Cox, P.A.; McFarland, S.R. und Ghidoni, J.J. (1984): Some factors that influence prolonged interfacial continuity, J Biomed Mat Res 18, Seite 403-412.
73. Harrison, R.G. (1911): On the stereotropism of embryonic cells, Science [44], Seite 279.

74. Hattori, S.; Andrade, J.D.; Hibbs, J.B.JR; Gregonis, D.E. und King, R.N. (1985): Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers, *J Colloid Interface Sci* 104, Seite 72-78.
75. Helmus, M.N. und Hubbell, J.A. (1993): Materials Selection, *Cardiovasc Pathol* 3 (Suppl) [2], Seite 53S-71S.
76. Hoeft, S. (1989): Entwicklung funktionsorientierter Bestimmungsmethoden für Fibronectin auf der Basis ligandenspezifischer Wechselwirkungen: Untersuchungen zur Modulation dieser Interaktionen und pathophysiologische Konsequenzen., Freie Universität, Medizinische Fachbereiche, Berlin.
77. Hohlfeld, Th. (2000): In-vitro-Modell zur Testung der Haftung von Haut (HaCat-Zellkultur) an oberflächenmodifizierten Abutments bei kraniofazialen Implantaten, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Humboldt-Universität, Berlin.
78. Holgers, K. M.; Thomsen, P.; Tjellström, A. und Bjursten, L. M. (1995): Immunohistochemical study of the soft tissue around long-term skin-penetrating titanium implants, *Biomaterials* 16 [8], Seite 611-616.
79. Holgers, K.M.; Paulsson, M.; Bjursten, L.M.; Tjellström, A. und Ljungh, Å. (1994): Selected microbial findings in association with percutaneous titanium implants, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 5 [9], Seite 565-570.
80. Holgers, Kajsa-Mia (1994): Soft tissue reactions around clinical skin-penetrating titanium implants, Department of Anatomy and Cell Biology, Department of Oto-Rhino-Laryngology, Sweden, University of Göteborg, Göteborg.
81. Holgers, KM.; Roupe, G.; Tjellström, A. und Bjursten, L.M. (1992): Clinical, immunological and bacteriological evaluation of adverse reactions to skin-penetrating titanium implants in the head and neck region., *Contact Dermatitis* [27], Seite 1-7.
82. Horn, M. und Vollandt, R. (1995): Multiple Tests und Auswahlverfahren, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena New York.
83. Ingber, D.E. (1993): Cellular tensegrity; defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton, *J Cell Sci* [104], Seite 613-627.
84. Ingber, D.E. (1994): Cellular tensegrity and mechanochemical transduction, Van, C.; Mow, F; Guilak, R.; Tran-Son-Tay, R.M. und Hochmuth, R.M., *Cell mechanics and cellular engineering* Seite 329-342, Springer, New York.

85. Jansen, J.A.; van der Waerden, J.P.C.M. und de Groot, K (1989): Effect of surface treatments on attachment and growth of epithelial cells, *Biomaterials* 10 [9], Seite 604-608.
86. Jansen, J.A.; van der Waerden, J.P.C.M. und de Groot, K (1991): Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials, *Biomaterials* 12, Seite 25-31.
87. Jansen, J.A.; Waerden, J.P.v.d. und Groot, K.d. (1990a): Development of a new percutaneous access device for implantation in the soft tissues, *J. Biomed Mater Res* 25, Seite 1535-1541.
88. Jauregui, H. O. (1987): Cell Adhesion to Biomaterials. The Role of Several Extracellular Matrix Components in the Attachment of Non-transformed Fibroblasts and Parenchymal Cells, *Trans Am Soc Artif Intern Organs XXXIII*, Seite 66-74.
89. Keller, John C.; Stanford, Clark M.; Wightman, James P.; Draughn, Robert A. und Zaharias, Rebecca (1994): Characterizations of titanium implant surfaces. III, *Journal of Biomedical Materials Research* 28 [8], Seite 939-946.
90. Klein, M.; Hohlfeld, T.; Moormann, P. und Menneking, H. (2000): Improvement of epidermal adhesion by surface modification of craniofacial abutments., *Int J Oral Maxillofac Implants* 15 [2], Seite 247-251.
91. Klein, M.; Menneking, H. und Bier, J. (1999a): Clinical experience with a device to enhance craniofacial periimplantary wound healing. A clinical report., *J Prosthet Dent* 82, Seite 631 – 632.
92. Klein, M.; Menneking, H.; Schmitz, H.; Locke, H.G. und Bier., J (1999b): A new generation of facial prostheses with myoelectrically driven moveable upper lid, *Lancet*, Seite 353.
93. Klein, M.; Menneking, H.; Zill, E.; Grosse-Siestrup, Ch. und Bier, J. (1998): Bakterielle Besiedlung der periimplantären Tasche des extraoralen Implantates. Fortschritte in der chirurgischen Prothetik und Epithetik., 10th International Symposium of Surgical Prosthetics and Epithetics and 13th Annual Conference of the American Anaplastology Association, Linz (Österreich).
94. Klein, Martin (1999): Epithetische Versorgung tumorbedingter Nasendefekte, *HNO* [47], Seite 623-628.

95. Klein, Martin (2001): Implantatfixierte Orbitaepithese mit myoelektrisch gesteuertem beweglichem Oberlid, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen; Charité Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, Berlin.
96. Klinkmann, H.D. und Falkenhagen (1989): Biokompatibilität: Die Notwendigkeit einer komplexen Betrachtung. Wissenschaftliche Information, Aktuelle Nephrologie 4 [22], Seite 155-130.
97. Knabe, C.; Große-Siestrup, C. und Gross, U. (1995): Histological evaluation of a natural permanent percutaneous structure as compared to clinical percutaneous devices, 5th Annual Conference, Australian Society for Biomaterials, Melbourne Australia.
98. Knabe, C.; Große-Siestrup, Ch.; Hunder, A. und Ziemann, A. (1997): A computer-assisted in-vitro biomaterial test for percutaneous devices using human keratinocyte cultures, J Mater Sci: Materials in Medicine 8, Seite 577-582.
99. Kononen, M.; Hormia, M.; Kivilahti, J.; Hautaniemi, J. und Thesleff, I. (1992): Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium, J Biomed Mater Res 26, Seite 1325-1341.
100. Kossowsky, N.; Heggers, J. P. und Robson, M. C. (1987): Fibronectin - Struktur, Funktion und mögliche Bedeutung für die Wundheilung., Wokalek, H. und Schöpf, E., Wundheilung Seite 66-75, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
101. Kothari, S.; Hatton, P.V. und Danglas, C.W.I. (1995): Protein adsorption to titanic surface, J Mater Sci 6, Seite 695-698.
102. Larson, T.; Aspden, R.M. und Heinegård, D. (1991): Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis in vitro, Matrix 11, Seite 388-394.
103. Lodish, Harvey; Baltimore, David; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul und Darnell, James (1996): Mikrofilamente: Zellbewegung und Zellgestalt, Molekulare Zellbiologie Seite 1019-1078, de Gruyter.
104. Mackenzie, I.C.; Bohnert, A.; Breitzkreutz, D. und Fusenig, N.E. (1989): Effect of mesenchyme on growth and differentiation of mouse skin keratinocytes in recombination cultures on collagen gels and bovine lens capsule.

105. Maloney, William J.; Sun, Doo-Hoon; Nakashima, Yasuharu; James, Ron und Smith, R. Lane (1998): Effects of serum protein opsonization on cytokine release by titanium-alloy particles, *J Biomed Mater Res* 41, Seite 371-376.
106. Manly, R.S. (1970): Adhesion in biological system, Academic Press, New York.
107. Martin, J.Y.; Schwartz, Z.; Hummert, T.W.; Schraub, D.M.; Simpson, J.; Lankford, J.J.R.; Dean, D.D.; Cochran, D.L. und Boyan, B.D. (1995): Effect of titanium surface roughness on proliferation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63), *J Biomed Mater Res* 29, Seite 389-401.
108. McCauley, Robert L.; Riley, William B.; Juliano, Rudolph A.; Brown, Patricia; Evans, Michael J. und Robson, Martin C. (1990): In Vitro Alterations in Human Fibroblast Behaviour Secondary to Silicone Polymers, *Journal of Surgical Research* 49, Seite 103-109.
109. Menneking, H.; Klein, M.; Locke, H.G. und Gonschior, S. (1998): Pflegemaßnahmen bei knochenverankerten Gesichtsepithesen, *HNO* [46], Seite 579-582.
110. Meyle, J.; Gültig, K.; Hüttemann, W. und Recum, A. F.v. (1994): Oberflächenmorphologie und Zellreaktion, *Z Zahnärztl Implantol* [10], Seite 51-60.
111. Meyle, J.; Rekum, A.F.v.; Gibbesch, B.; Hüttemann, W.; Schlagenhauf, U. und Schulte, W. (1991): Fibroblast shape conformation to surface micromorphology, *J Appl Biomat* [2], Seite 273.
112. Montagna, W. (1971): Cutaneous Comparative Biology, *Archives of Dermatology* 6 [104], Seite 577-591.
113. Montagna, W. und Parakkal, P.F. (1974): The Structure and Function of Skin, 3rd ed. Auflage.
114. Mostardi, Richard A.; Meerbaum, Sharon O.; Kovacic, Mark W. und Gradisar, Jr. Ivan A. (1999): In vitro response of human fibroblasts to commercially pure titanium, *J Biomed Mater Res* 47, Seite 60-64.
115. Newesely, H. (1981): Implantatmaterialien. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung., Heidelberg, Hüthig.
116. Niedrig, H. (1992): Physik, Springer-Verlag.

117. Nühlen, U. und Große-Siestrup, C. (1992): Keratinocyte Cell Cultures for testing Polymers for Percutaneous Devices, Lemm, W., The Reference Materials of the European Communities. Results of hemocompatibility tests Seite 217-225, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
118. Ohara, P.T. und Buck, R.C. (1979): Contact guidance in vitro. A light, transmission, and scanning electron microscopic study., Exp Cell Res [121], Seite 235-249.
119. O'Keefe, M.D., Edward J.; Payne, Jr., B.S., Richard E.; Russell, B.S., Nancy und Woodley, M.D., David T. (1985): Spreading and Enhanced Motility of Human Keratinocytes on Fibronectin, THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 85 [2], Seite 125-130.
120. Paquay, Y.C. und Ruijter, J.E. (1994): Titanium fibre mesh anchorage for percutaneous devices., The 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Boston, MA, USA.
121. Parel, S. M.; Branemark, P. I. und Jansson, T. (1986): Osseointegration in maxillofacial prosthetics. Part I: Intraoral applications, J Prosthet Dent 55 [4], Seite 490-4.
122. Parel, S.M. und Tjellström, A. (1991): The United States and Swedish experience with osseointegration and facial prosthesis, Int J Oral Maxillofac Impl 6, Seite 75-79.
123. Polanski, J.; Freed, P.; Wasfie, T.; Kantrowitz, A.; Vaughan, F.; Bernstam, L.; Gray, R. und Bernstein, I. (1984): Inhibition of epithelial downgrowth on percutaneous access devices in swine, ASAIO Trans [30], Seite 556.
124. Powers, D.L.; Henricks, H.L. und Recum, A.F.v. (1986): Percutaneous healing of clinical tympanic membrane implants, J Biomed Mat Res 20, Seite 143-151.
125. Räisänen, L.; Könönen, M.; Juhanoja, J.; Varpavaara, P.; Hautaniemi, J.; Kivilahti, J. und Hormia, M. (2000): Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces, Journal of Biomedical Materials Research 49 [1], Seite 79-87. URL: Institute of Dentistry, University of Helsinki, P.O. Box 41, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland
126. Department of Prosthetic Dentistry and Stomatognathic Physiology, Royal Dental College, University of Aarhus, Vennelyst Boulevard, DK-8000 Aarhus C, Denmark

127. Institute of Biotechnology, Electron Microscopy, University of Helsinki, Biocenter 1, P.O. Box 56, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland
128. Department of Applied Physics, University of Turku, FIN-20014 Turku, Finland
129. Department of Materials Science and Engineering, Helsinki University of Technology, Vuorimiehentie 2, FIN-02150 Espoo, Finland
130. Institute of Dentistry, Department of Periodontology, University of Turku, Lemminkäisenkatu 2, FIN-20520 Turku, Finland
131. Ratner, B.D.; Hoffmann, A.S.; Schoen, F.J. und Lemons, J.E. (1996): Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press.
132. Recum, A.F.v. (1984): Applications and failure modes of percutaneous devices: A review, J Biomed Mat Res 18, Seite 323-336.
133. Recum, A.F.v. und Park, J. B. (1981): Permanent Percutaneous Devices, CRC Critical Reviews in Bioengineering [January], Seite 37-71.
134. Recum, A.F.v.; Shannon, C.E.; Cannon, E.C.; Long, K.J.; Van Kooten, T.G. und Meyle, J. (1996): Surface roughness, porosity, and texture as modifiers of cellular adhesion, Tissue Eng [2], Seite 241-253.
135. Remes, A. und Williams, D.F. (1992): Immune response in biocompatibility, Biomaterials 13 [11], Seite 731-743.
136. Rook, Arthur et al. (1986): Textbook of Dermatology 3, 4th. Auflage.
137. Rosengren, Agneta; Danielsen, Nils und Bjursten, Lars M. (1999): Reactive capsule formation around soft-tissue implants is related to cell necrosis, J Biomed Mater Res 46, Seite 458-464. URL: Department of Experimental Research, University Hospital MAS, S-205 02 Malmö, Sweden
138. Department of Physiological Sciences, Section for Neuroendocrine Cell Biology, Lund University, EA-blocket, Lund
139. University Hospital, S-221 85 Lund, Sweden
140. Ross, R. (1969): Wound healing, Sci. Am. 220, Seite 40.
141. Rostlund, T. und Thompson, P. (1990): Difference in tissue response to nitrogen-ion-implanted titanium and commercially pure titanium in the abdominal wall of the rat., J Biomed Mater Res 24, Seite 847-860.
142. Ruardy, T.G.; Schakenraad, J.M.; van der Mei, H.C. und Busscher, H.J. (1995): Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces, J Biomed Mater Res 29, Seite 1415-1423.

143. Ruoslahti, E. (1991): Integrins, J Clin Invest 87, Seite 1-5.
144. Salthouse, Thomas N. (1984): Some aspects of macrophage behavior at implant interface, Journal of Biomedical Materials Research 18, Seite 395-401.
145. Sauberlich, S.; Klee, D.; Richter, E.J.; Hocker, H. und Spiekermann, H. (1999): Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces, Clin Oral Implants Res 10 [5], Seite 379-393.
146. Scales, J.T. und Winter, G.D. (1961): The adhesion of dressings an experimental study. (Proc of a symposium held on 12-13 Nov 1959), Wound Healing, New York.
147. Scharffetter-Kochanek, K.; Klein, C. E.; Heinen, G.; Mauch, C.; Schaefer, T.; Adelman-Grill, B. C.; Goerz, G.; Fusenig, N. E.; Krieg, T. M. und Plewig, G (1992): Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the $\alpha 2\beta 1$ -integrin receptor., Journal of Investigative Dermatology 98 [1], Seite 3-11.
148. Schmidt, Rainer (1999): Werkstoffverhalten in biologischen Systemen: Grundlagen, Anwendungen, Schädigungsmechanismen, Werkstoffprüfung, 2. Auflage, Schmidt, Rainer, Springer, Berlin (u.a.).
149. Sharkawy, AA; Klitzman, B; Truskey, GA und Reichert, WM (1998): Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties., J Biomed Mater Res 40 [4], Seite 586-97.
150. Singhvi, R.; Stephanopoulos, G. und Wand, D.I.C. (1994): Review: effects of substratum morphology on cell physiology, Biotechnol Bioeng [43], Seite 764-771.
151. Srivastava, S.; Gorham, S.D. und Courtney, J.M. (1990): The attachment and growth of an established cell line on collagen, chemically modified collagen, and collagen composite surfaces, Biomaterials 11, Seite 162-167.
152. Steigleder, G.K. (1990): Haut und Hautanhangsgebilde, Eder, M. und Gedigk, P., Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, 33. Auflage, Seite 784-817, Springer, Berlin, Heidelberg.
153. Thiele, R. (1983): Thrombozytenadhäsion an Kunststoffoberflächen vor und nach Proteinisierung, in vitro und in vivo, Medizinische Fakultät, Freie Universität Berlin, Berlin.
154. Thomsen, P. und Bjursten, L.M. (1982): Implants in the abdominal wall of the rat., Scand J Plat Reconst Surg 20, Seite 173-182.

155. Tjellström, A. (1989 a): Osseointegrated systems and their applications in the head and neck, *Adv Otolaryngo. Head Neck Surg.* 3, Seite 39-70.
156. Tjellström, A.; Albrektson, T.; Brånemark, P.-I.; Lindström, J. und Nylen, O. (1981): The Bone-Anchored Auricular Episthesis, *Laryngoscope* 91, Seite 811-815.
157. Tjellström, Anders (1989): Titanimplantate in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, *HNO* [37], Seite 309-314.
158. Toljanic, Joseph A. und Morello, Josephine A. (1995): Microflora Associated With Percutaneous Craniofacial Implants Used for the Retention of Facial Prostheses: A Pilot Study, *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS* [10], Seite 578-582.
159. Trentz, O.A.; Zellweger, R.; Amgwerd, M.G. und Uhlschmid, G.K. (1997): Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten, *Unfallchirurg* 100, Seite 39-43.
160. Tsiboulakis, J.; Stone, M.; Thorpe, A.A.; Graham, P.; Peters, V.; Heerlin, R.; Smith, J.R.; Green, K.L. und Nevell, T.H. (1999): Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach, *Biomaterials* [20], Seite 1229-1235.
161. van Kooten, Theo G.; Whitesides, John F. und von Recum, Andreas F. (1998): Influence of Silicone (PDMS) Surface Texture on Human Skin Fibroblast Proliferation as Determined by Cell Cycle Analysis, *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 43, Seite 1-14. URL: In vivo biocompatibility of silicone materials is heavily debated nowadays. Although much attention is focused on causal relationships between the presence of siliconecontaining implants and the developement of autoimmune disorders, which has not been proven, the more profound problem of capsule formation persists.
162. Wacker, W.E.C. et al. (1956), *New Eng J Med*, Seite 225:449.
163. Walboomers, X.F.; Croes, H.J.E.; Ginsel, L.A. und Jansen, J.A. (1998): Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene, *Biomaterials* [19], Seite 1861-1868.
164. Walboomers, X.F.; Croes, H.J.E.; Ginsel, L.A. und Jansen, J.A. (1999): Contact guidance of rat fibroblasts on various implant materials, *J Biomed Mater Res* 47, Seite 204-212.

165. Webb, Ken; Hlady, Vladimir und Tresco, Patrick A. (1998): Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization, J Biomed Mater Res 41, Seite 422-430. URL: Center for Biopolymers at Interfaces, Department of Bioengineering, 2480 Merrill Engineering Building, University of Utah, Salt Lake City, Utah 84112
166. Weiss, L. und Blumenson, L..E. (1967): Dynamic adhesion and separation of cells in vitro. 2 Interactions of cells with hydrophilic and hydrophobic surfaces., Journal of Cellular Physiology 70, Seite 23-32.
167. Weiss, L.A. (1970): A biophysical consideration of cell contact phenomena., Manly, R.S., Adhesion in biological systems Seite 1-48, Academic Press, New York.
168. Weiss, Leonard (1964): Cellular Lokomotive Pressure in Relation to Initial Cell Contacts, J. Theoretic. Biol. [6], Seite 275-281.
169. Weiss, P. (1934): In vitro experiments on the factors determining the course of outgrowing nerve fiber, J Exp Zool [68], Seite 393.
170. Weiss, P. (1945): Experiments on cell and axon orientation in vitro: the role of colloidal exudates in tissue organization, J Exp Zool 100, Seite 353-386.
171. Williams, D.F. (1976): Biomaterials and Biocompatibility, Med. Progr. Technol. [4], Seite 31-42.
172. Williams, D.F. (1981): Biocompatibility in Clinical Practice 2, CRC, Boca Rota.
173. Williams, D.F. (1987): Definitions in Biomaterials, Consensus conference of the European Society for Biomaterials, Cester, England.
174. Williams, D.F. (1987): Definitions in Biomaterials: Progress in Biomedical Engineering, 4th. Auflage, Elsevier Science, Amsterdam.
175. Williams, D.F. (1987): Review Tissue-biomaterial interactions, J. Mater. Sci. [22], Seite 3421-34445.
176. Williams, D.F.; Black, J.; Doherty, P.J. (1992): Second Consensus conference of the European Society for Biomaterials, Elsevier, Amsterdam, Amsterdam, Niederlande.
177. Winter, G.D. (1962): Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the domestic pig, Nature 193, Seite 293-294.
178. Winter, G.D. (1974): Transcutaneous implants: Reactions of the skin-implant interface, J Biomed Mat Res Symp 1 [5], Seite 99-113.

180. Wintermantel, E.; Mayer, J.; Ruffieux, K.; Bruinink, A. und Eckert, K.-L. (1999): Biomaterialien - humane Toleranz und Integration, Chirurg 70, Seite 847-857.
181. Wokalek, H. (1988): Cellular Events in Wound Healing, CRC Critical Reviews in Biocompatibility 4 [3], Seite 209-246.
182. Woodley, D.T.; Bachmann, P.M. und O`Keefe, E.J. (1988): Laminin inhibits human keratinocyte migration, Journal of Cellular Physiology 136, Seite 140-146.
183. Ziats, N.P.; Miller, K.M.. und Anderson, J.M. (1988): In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials, Biomaterials 9 [January], Seite 5-13.

8 Anhang

8.1 Materialien

Tab. 11: in den Vor- und Hauptversuchen verwendete Materialien

Polierte Abutments (Ø=4,5mm, L=4,0mm)	chemische Zusammensetzung: Ti: 99,75%, C: 0,05%, Fe: 0,05%, H: 0,01%, N: 0,03%, O: 0,1%; Bränemark, Fa. Entific Medical Systems, Bad Oeynhausen
Titanscheiben (Ø=5mm, Stärke 2mm)	chemische Zusammensetzung: Reintitan Grad 3, C: 0,01%, Fe: 0,10%, H: 0,0026%, N: 0,02%, O: 0,15%; Charge D 9808011, Fa. EURO-TITAN Handels AG, Solingen
Titanscheiben (Ø=5mm, Stärke 1mm)	hergestellt an der Technischen Universität Berlin, Analyse siehe Kap. 4.5.3 Oberflächenmodifikationen: <ol style="list-style-type: none"> 1. polierte, 2. sandgestrahlte, 3. glaskugelgestrahlte 4. silikonbeschichtete 5. plane und Kollagen-A-beschichtete davon je zur Hälfte plasmasterilisiert
Sandstrahlgerät Widder 100	Korngröße 100-200µm, Fa. Sapi, Nördlingen
Primer	Wacker Grundierung G790, Ottobrunn/Riemerling
Radio-frequency-glow-discharge-Gerät	Argon-Atmosphäre bei 1 bar, Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-32 G, Harrick, Ossining, New York, USA. (RFGDT)
Silikonschicht	lufttrocknende Silikonschicht (Rehau 1511/THF (Tetrahydrophan) 1:4)
Collagen A (95%Kollagen I + 5% Kollagen IV)	1mg/ml, Cat.No. L 7220, Lot No. 463 X, Biochrom AG, Berlin
Petri-Schalen	Falcon 1034, Becton Dickinson & Company, New Jersey, USA, aus disponiblen Polystyrol, Style 65 x 15mm with 10 mm grid
96-Loch-Mikrotiterplatten	Falcon 3072, Becton Dickinson & Company, New Jersey, USA, Gamma bestrahlt, Well-Ø von 6,5mm; Volumen eines Wells: $\text{Grundfläche} \times \text{Höhe} = r^2 \times h = 3,252 \times 3,14159\text{mm}^3$, $\text{Wellbodenfläche: } \pi \times r^2 = 33,18\text{mm}^2$
Ultraschallreiniger	„Sonorex“, Fa. Bandelin, Berlin

Elmex-Interdentalbürste	Fa. Wybert, Lörrach
Normal Human Fibroblasts (HFIB)	proliferating, Cat.-No.: HCC-4001, Lot 033F300499, Cryo vom 14.10.99, ≥ 500000 proliferating cells/25 cm ² flask, Fa. Cell-Lining, Berlin
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, 500 ml versetzt mit:	(Fa. Sigma®) with 4500mg glucose/L, L-glutamine, pyridoxine. HCL and NaHCO ₃ , D-5796, Lot No. 69H2377, Fa. SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Hepes Puffer (1M), 5 ml	H-0887, Lot No. 86H2392, Fa. SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Antibiotic Antimycotic , 5 ml	(10.000 E. Penicillin/ml, 10mg Streptomycin and 25µg Amphotericin B per ml), A-9909, Fa. SIGMA - ALDRICH; St.Louis, USA
Feta-Bovine-Serum, 50 ml	seromed®, Cat.No. S 0113, Lot No. 371 S, Fa. Biochrom KG, Berlin
BME-Vitamines (100 x), 5 ml	seromed® Fa. Biochrom KG, Berlin
Trypsinlösung	Trypsin (1:250) 2,5% (w/v) in PBS w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Cat.No. L 2133, Lot No. 327 X, Fa. Biochrom KG, Berlin
Pufferlösung	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , seromed®, Cat.No. L 1823, Lot No. 564 U, Fa. Biochrom KG, Berlin
Trypanblaulösung	0,5%ig in physiologischer Kochsalzlösung, Cat.No. L 6323, Lot No. 444 U, Fa. Biochrom KG, Berlin
Dimethyl Sulfoxide Sigma®	(Methyl Sulfoxide; DMSO), EEC No 200-664-3, Lot 76H3654, Sigma Chemical Co. P.O. Box 14508 St. Louis, MO63178 USA
Einfrierkapseln	Nalgene® Cryoware, Cryogenic Vials, Cat.No. 5000-0020, Nalge Company, Rochester, NY, USA
In vitro Assay zur quantitativen LDH-Bestimmung	Reagenz 1: Puffer/Pyruvat, 6 x 66ml, Reagenz 2: NADH, 6 x 66ml, Best.-Nr. 1876961, Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim
Computersystem zur Extinktionsmessung	Dynatech Revelation G 2.0, Testfilter 340nm, Referenzfilter 570nm, Dynatech Deutschland GmbH
Lichtmikroskop	Olympus CK 2, Tokyo, Japan

8.2 Tabellen

Tab. 12: Übersicht sämtlicher Ergebnisse der Zellzählung nach 12 Stunden Zellkultivierung

Oberflächen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zellzahl	12500	25000	12500	17500	30000	25000	10000	5000	20000	22500
Zellzahl	16000	22500	17500	25000	25000	25000	7500	10000	17500	25000
Zellzahl	12500	25000	18000	25000	22500	22500	7500	7500	17500	25000
Zellzahl	20000	20000	20000	22500	20000	20000	10000	7500	17500	22500
Zellzahl	20000	25000	18000	22500	30000	25000	10000	5000	20000	20000
Zellzahl	12500	20000	20000	22500	25000	25000	7500	7500	22500	25000
Zellzahl	17500	25000	18000	17500	30000	20000	7000	7500	17500	18000
Zellzahl	12500	20000	17500	22500	20000	22500	10000	10000	17500	20000
Zellzahl	15000	17500	12500	20000	25000	20000	10000	5000	15000	17500
Zellzahl	18000	18000	12500	18000	20000	22500	7500	5000	17500	25000
Zellzahl	16000	25000	18000	25000	30000	20000	10000	7500	17500	22500
Zellzahl	20000	22500	12500	25000	20000	20000	5000	7500	20000	18000
Zellzahl	12500	25000	17500	25000	22500	22500	10000	10000	15000	25000
Zellzahl	17500	20000	12500	25000	25000	25000	10000	7500	17500	17500
Zellzahl	16000	25000	16000	22500	30000	27500	10000	7500	20000	25000
Zellzahl	12500	17500	12500	22500	22500	25000	10000	10000	20000	25000
Zellzahl	16000	25000	17500	25000	30000	20000	5000	7500	17500	18000
Zellzahl	15000	25000	17500	30000	25000	22500	10000	10000	17500	25000
Zellzahl	15000	22500	12500	25000	25000	20000	10000	5000	15000	22500
Zellzahl	18000	18000	17500	22500	22500	22500	5000	5000	15000	22500
Summe	315000	443500	320500	460500	500000	452500	172000	147500	357500	441500
mittlere Zellzahl	15750	22175	16025	23025	25000	22625	8600	7375	17875	22075
mittlere lineare Abweichung	2175,00	2640,00	2470,00	2277,50	3000,00	1912,50	1680,00	1425,00	1525,00	2552,50
STBAW	2672,96	2988,02	2783,76	3054,22	3804,43	2361,28	1916,69	1897,89	2031,82	2988,02
Median	16000	22500	17500	22500	25000	22500	10000	7500	17500	22500

1= kugelgestrahlt, 2= 1+ RF GD, 3= sandgestrahlt, 4= 3+ RF GD, 5= poliert, 6= 4+ RF GD, 7= silikonbeschichtet, 8= 7+ RF GD, 9= kollagenbeschichtet, 10= 9+ RF GD

Tab. 13: Übersicht sämtlicher Ergebnisse der Zellzählung nach 72 Stunden Zellkultivierung

Oberflächen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zellzahl	46000	35000	30000	35000	35000	62500	15000	12500	25000	55000
Zellzahl	35000	32500	27000	30000	40000	55000	12500	7500	35000	50000
Zellzahl	30000	37500	37500	35000	40000	55000	7500	7500	32500	50000
Zellzahl	27500	35000	25000	30000	32500	62500	10000	5000	27500	57500
Zellzahl	25000	32500	27500	45000	45000	70000	12500	5000	27500	57500
Zellzahl	25000	50000	30000	30000	30000	62500	10000	10000	27500	62500
Zellzahl	35000	30000	27500	37500	35000	62500	15000	7500	30000	62500
Zellzahl	35000	32500	40000	35000	32000	60000	10000	7500	30000	60000
Zellzahl	25000	35000	27500	40000	37000	55000	7500	5000	27500	50000
Zellzahl	25000	35000	25000	37500	35000	67500	12500	7500	25000	65000
Zellzahl	40000	35000	27500	45000	40000	62500	12500	7500	25000	62500
Zellzahl	25500	32500	40000	42500	35000	55000	7500	7500	45000	57500
Zellzahl	30000	45000	37500	35000	32500	55000	15000	5000	32500	50000
Zellzahl	27500	35000	30000	40000	45000	62500	7500	7500	22500	62500
Zellzahl	37500	32500	27500	40000	35000	70000	12500	10000	25000	60000
Zellzahl	27000	35000	35000	35000	30000	62500	10000	5000	27500	62500
Zellzahl	37500	40000	37500	37500	42500	62500	12500	5000	30000	62500
Zellzahl	35000	35000	35000	45000	35000	60000	7500	7500	35000	57500
Zellzahl	25000	32500	27500	37500	35000	55000	15000	7500	27500	50000
Zellzahl	27500	45000	35000	45000	40000	67500	12500	10000	27500	65000
Summe	620000	722500	629500	757500	731500	1225000	225000	147500	585000	1160000
mittlere Zellzahl	31000	36125	31475	37875	36575	61250	11250	7375	29250	58000
Mittlere lineare Abweichung	5200,00	3687,50	4570,00	3950,00	3690,00	4000,00	2375,00	1425,00	3600,00	4500,00
STB _{AW}	6.028,44	5.096,12	5.113,13	4.952,07	4.484,70	5.032,79	2.750,80	2.063,94	5.006,57	5.416,84
Median	28750	35000	30000	37500	35000	62500	12500	7500	27500	58750

1= kugeliggestrahlt, 2= 1+ RFGD, 3= sandgestrahlt, 4= 3+ RFGD, 5= poliert, 6= 4+ RFGD, 7= silikonbeschichtet, 8= 7+ RFGD, 9= kollagenbeschichtet, 10= 9+ RFGD

Tab. 14: Qualitative Auswertung des Fibroblastenwachstums nach 12stündiger Kultivierung

	Wachstum	Zellorientierung	überwiegende Zellform	Zellrasen	Actinfilamente	Mikrovilli
kugelgestrahlt	2'	überwiegend diffus, teilweise parallel	länglich abgeflacht, teils polygonal	weites Maschenwerk	+	(+)
kugelgestrahlt + RFGD	3'	überwiegend diffus, teilweise parallel	länglich abgeflacht, bis polygonal	weites Maschenwerk	(+)	(+)
sandgestrahlt	2'	diffus, teilweise parallel	länglich abgeflacht, teils polygonal	weites Maschenwerk	+	(+)
sandgestrahlt + RFGD	3'	diffus, teilweise parallel	länglich bis breit abgeflacht	weites Maschenwerk	(+)	(+)
poliert	3'	diffus, teilweise parallel	länglich und stark abgeflacht	weites Maschenwerk	++(+)	-
poliert + RFGD	2'	diffus, teilweise parallel	länglich abgeflacht	sehr weites Maschenwerk	+(+)	-
Silikon	1'	diffus	teils länglich abgeflacht, teils polygonal	weites Maschenwerk,	+	+
Silikon + RFGD	1'	diffus	länglich, Randwülste	nur einzelne Zellnester	+	++
Kollagen	2'	diffus, teilweise parallel	länglich bis abgeflacht	nur einzelne Zellnester	+	-
Kollagen + RFGD	3'	diffus, überwiegend parallel	länglich bis breit abgeflacht	enges Maschenwerk	+	(+)

Tab. 15: Qualitative Auswertung des Fibroblastenwachstums nach 72stündiger Kultivierung

	Wachstum	Zellorientierung	überwiegende Zellform	Zellrasen	Actinfilamente	Mikrovilli
kugelgestrahlt	5'	diffus, Überwiegend parallel	länglich abgeflacht	dichtes Maschenwerk	++	++
kugelgestrahlt + RFGD	6'	diffus, Überwiegend parallel	länglich bis breit abgeflacht	dichtes Maschenwerk, z.T. Polylayer	+	++
sandgestrahlt	5'	diffus, teilweise parallel	breit abgeflacht	dicht, z.T. Polylayer	++	(+)
sandgestrahlt + RFGD	6'	diffus, teilweise parallel	breit abgeflacht	dicht, Überwiegend Polyfayer	++	(+)
poliert	5'	diffus, Überwiegend parallel	länglich abgeflacht	dichtes Maschenwerk	+++	+
poliert + RFGD	5'	diffus, teilweise parallel	länglich abgeflacht	dicht, z.T. Polylayer	++	+
Silikon	2'	diffus	teils länglich, teils abgeflacht	weites Maschenwerk, Zellen teilweise überlappend	+(+)	+
Silikon + RFGD	1'	diffus	länglich	nur einzelne Zellnester	+	++
Kollagen	4'	diffus, teilweise parallel	länglich bis abgeflacht	dichtes Maschenwerk	+	-
Kollagen + RFGD	7'	diffus, Überwiegend parallel	länglich bis breit abgeflacht	dicht, Überwiegend Polyfayer	+	-

8.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 a,b:	S. 2	Abb. 27 a,b:	S. 50
Abb. 2:	S. 3	Abb. 28:	S. 51
Abb. 3:	S. 4	Abb. 29 a,b:	S. 51
Abb. 4 a,b:	S. 5	Abb. 30 a,b:	S. 52
Abb. 5:	S. 7	Abb. 31 a,b:	S. 52
Abb. 6:	S. 9	Abb. 32:	S. 54
Abb. 7:	S. 11	Abb. 33:	S. 54
Abb. 8:	S. 16	Abb. 34 a-d:	S. 56
Abb. 9:	S. 16	Abb. 35 a-c:	S. 57
Abb. 10:	S. 19	Abb. 36:	S. 74
Abb. 11:	S. 22		
Abb. 12:	S. 29	Tab. 1:	S. 18
Abb. 13:	S. 30	Tab. 2:	S. 31
Abb. 14:	S. 32	Tab. 3:	S. 38
Abb. 15:	S. 32	Tab. 4:	S. 39
Abb. 16:	S. 33	Tab. 5:	S. 40
Abb. 17:	S. 38	Tab. 6:	S. 42
Abb. 18:	S. 41	Tab. 7:	S. 43
Abb. 19:	S. 41	Tab. 8:	S. 45
Abb. 20:	S. 44	Tab. 9:	S. 53
Abb. 21:	S. 44	Tab. 10:	S. 58
Abb. 22:	S. 46	Tab. 11:	S. 95
Abb. 23:	S. 48	Tab. 12:	S. 97
Abb. 24 a,b:	S. 49	Tab. 13:	S. 98
Abb. 25 a,b:	S. 49	Tab. 14:	S. 99
Abb. 26 a,b:	S. 50	Tab. 15:	S. 99

8.4 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. dent. M. Klein, leitender Oberarzt der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Charité - Campus Virchow-Klinikum, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und für die engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. Ch. Große-Siestrup, Leiter des tierexperimentellen Instituts des Forschungshauses der Charité, danke ich sowohl für seine Bereitschaft zu offenem Gespräch, die vielen Gedankenanstöße und fundierten Informationen bezüglich der Problematik von Hautdurchleitungen als auch für die Bereitstellung des Zellkulturlabors seines Instituts, ohne welche die Durchführung der Zellkulturversuche wohl kaum möglich gewesen wäre.

Frau Vildan Essig gilt mein Dank für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, die vielen nützlichen Tipps beim Erlernen der Zellkultivierung, ihre Mithilfe bei der Materialbeschaffung und der Ermöglichung meines Zugangs zu anderen Fachabteilungen des Forschungshauses der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

Frau Gudrun Holland von der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Forschungshauses der Charité bin ich zu außerordentlichem Dank für ihre vortreffliche Unterstützung bei der Erstellung und Archivierung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen verpflichtet.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Kage und Herrn A. Salomon danke ich für ihre stets freundschaftliche Kooperation, die vielen intensiven und informativen Fachgespräche, die Bereitstellung ihres Zellkulturlabors im Forschungshaus sowie die fundierte Beratung hinsichtlich der diversen labortechnischen Vorversuche.

Herrn Dipl.-Ing. M. Meyer von der Technischen Universität Berlin danke ich ganz herzlich für die Herstellung der Titanplättchen und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von den verschiedenartig modifizierten Titanoberflächen. Seine stets kompetenten und ausführlichen Auskünfte, die unzähligen Fachinformationen und Literaturtipps zu Biomaterialien sowie zum Radio-Frequency-Glow-Discharge-Verfahren waren von größtem Wert.

Besonderer Dank gilt auch Frau Karsten und Herrn Baudisch vom Institut für Statistik der Humboldt-Universität Berlin, die mir einen wesentlichen Beitrag bei der statistischen Versuchsplanung leisteten. Für die statistische Auswertung bin ich Frau Dipl.-Math. Brandstaedt vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena sehr zu Dank verpflichtet.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn F. Hafner für seine exzellenten Fotoarbeiten.

Herrn Ernesto Miranda aus Chicago, USA, danke ich für seine vorzüglichen und prägnanten Zeichnungen.

Herrn Dr. - Ing. G.N. Duda von der Abteilung für Biomechanik des Forschungshauses der Charité, Campus Virchow-Klinikum, danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Messapparaturen zur Durchführung der Ausziehversuche im Rahmen der Vorversuche.

Für die abschließende Durchsicht des Manuskripts danke ich meinem Vater, Prof. Dr. med. K.-E. Richard und Frau Judith Dirks.

Allen Freunden und Familienangehörigen danke ich für ihre moralische Unterstützung.

Ganz besonders aber bin ich meiner kleinen Tochter, Clara, die unendliche Geduld aufbringen und so oft auf mich verzichten musste, in Dankbarkeit verbunden.

8.5 Lebenslauf

Eduard Matthias Richard, geb. 25.07.1959 in München
 Eltern: Prof. Dr.med. Karl-Eduard Richard, Neurochirurg
 Gabriele Eleonore Richard, geb. Heinen, Lehrerin

Ausbildung:

Schule:	1970 - 1979	Apostelgymnasium Köln-Lindenthal
	15. 5. 1979	Abitur
Wehrdienst:	1979 - 1980	Sanitätsbataillon Renerod/ Westerwald
Studium:	WS81 / SS83	Vorklinik an der Ruhr-Universität Bochum
	WS 1983	Fortsetzung des Studiums an der Universität Köln
	08. 6. 1988	3. Staatsexamen
	08. 7. 1988	Approbation als Arzt

Anstellungen:

Anatomie:	WS88/ SS89	Wissenschaftliche Hilfskraftstelle Anatomisches Institut II der Uni Köln
	08/89 - 06/ 91	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Anatomisches Institut II der Uni Köln Abteilung für Biomechanik
Unfallchirurgie:	07/91 - 07/ 92	Marienhospital Brühl
Kinderchirurgie:	07/92 - 12/ 93	Kinderkrankenhaus Köln-Riehl Akademisches Lehrkrankenhaus
DAAD-Stipendium: (Verbrennungs- u. Kinderchirurgie)	07/94 - 08/ 94	Hospital Guillermo Grant Benavente Concepción/ Chile
Allgemeinchirurgie:	01/94 - 10/ 99	St. Josef-Hospital Troisdorf
	26. 8. 1999	Anerkennung zum Facharzt für Chirurgie
Promotionsarbeit: (experimenteller Teil)	11/99 - 03/ 00	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Charité Campus Virchow Kliniken Doktorvater: PD. Dr. Dr. M.Klein
Herz-, Thorax- u. Gefäßchirurgie:	04/00 - 02/ 01	Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Thorax- u. Gefäßchirurgie:	seit 03/ 01	Fachkrankenhaus Coswig/ Dresden Zentrum für Pneumologie, Thorax- u. Gefäßchirurgie

Ich erkläre an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.